

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



## TESIS DOCTORAL

Nuevas estrategias para el control de la nosemosis en *Apis mellifera* L.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Cristina Rodríguez García

Directores

Aránzazu Meana  
Mariano Higes y Raquel Martín

**Madrid, 2018**



UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal

*Nuevas estrategias para el control de la nosemosis en Apis mellifera L.*

Tesis Doctoral

**Cristina Rodríguez García**

2017

Bajo la dirección de los doctores:

*Aránzazu Meana Mañes, Mariano Higes Pascual y Raquel Martín Hernández*



El trabajo presentado en esta tesis se ha realizado en el Centro de Investigación Apícola y Agroambiental de Marchamalo (CIAPA), adscrito al Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal (IRIAF) y el Departamento de Sanidad Animal de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), bajo la dirección de los Doctores Aránzazu Meana Mañes, Mariano Higes Pascual y Raquel Martín Hernández, como parte del proyecto RTA-2012-00076-C02-01 (INIA-FEDER). Así mismo, la autora ha disfrutado de una beca pre-doctoral otorgada por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) según Resolución de la convocatoria del 28 de Marzo de 2012 (BOE). Durante el desarrollo de la misma se ha realizado una estancia en el *United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service (USDA-ARS) Bee Research Laboratory*, en Maryland-EEUU, bajo la supervisión de la Dra. Yamping Chen. Además de varias estancias en el *Unità di ricerca di Apicoltura e Bachicoltura (CRA-API)* de Bolonia-Italia, bajo la supervisión de Antonio Nanetti. Las imágenes fotográficas que ilustran esta memoria son propiedad de Cristina Rodríguez García y Javier Almagro Berenguer.





**ARÁNZAZU MEANA MAÑES, MARIANO HIGES PASCUAL y RAQUEL MARTÍN HERNÁNDEZ,**  
Doctores en Veterinaria,

Informan:

Que **Cristina Rodríguez García**, licenciada en Biología, ha realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado “Nuevas estrategias para el control de la nosemosis en *Apis mellifera* L.”, que consideramos reúne las condiciones de calidad científica necesarias para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense.

Que, como resultado de este trabajo se han publicado hasta el momento, cuatro artículos en tres revistas del *Science Citation Index: Research in Veterinary Science, Journal of Apicultural Research, Spanish Journal of Agriculture Research y Applied and Environmental Microbiology*.

Que, durante la realización de este trabajo, se han presentado seis posters y dos comunicaciones orales a congresos nacionales e internacionales.

De lo que informamos en Madrid, a 13 de Marzo de 2017.

Fdo. **Aránzazu Meana Mañes**

Profesora Titular de la UCM

Fdo. **Mariano Higes Pascual**

Asesor Investigación del IRIAF-CIAPA

Fdo. **Raquel Martín-Hernández**

Investigadora del IRIAF-CIAPA



*“La felicidad de la abeja y la del delfín es existir. La del hombre  
es descubrir esto y maravillarse por ello”*

Jacques-Yves Cousteau (1910-1997)



*a mi familia*  
*a Darío*



*a mis abuelos/as,  
a ti Elena*





## AGRADECIMIENTOS

Quién me iba a decir a mí, cuando de pequeña estaba rodeada de juguetes de la abeja Maya, que corría entre bidones y tarros de miel, que mi primera feria de Pastrana fuese a los 7 años, y que los caramelos con sabor a miel que mi tía ponía en el mostrador del herbolario y que yo me guardaba a puñados en los bolsillos, iba a suponer una de las mejores decisiones que he tomado en la vida, aportar mi granito de arena trabajando en aquello que mi abuelo y mi tío han hecho durante años, aunque desde otra perspectiva.

Por ello, quiero agradecer en primer lugar a mis directores de tesis el Dr. Mariano Higes, la Dra. Raquel Martín y la Dra. Aránzazu Meana. Mariano y Raquel. Gracias por elegirme, por enseñarme tanto fuera y dentro del laboratorio, por contar conmigo para absolutamente todo, y por confiar en mí en tantas ocasiones.

**Mariano** gracias, por cuidarme tanto, por tus ánimos constantes, tus consejos, por los largos días de infecciones, por todo lo que me has enseñado, por hacer que al final... “todo fluya” y sin olvidar nuestras charlas de carreras, zapatillas y lesiones, y por dejarme adelantarte en una carrera metiendo el codo..... sé que no me guardas rencor.

**Raquel**, eres increíble, gracias por confiar en mí, por ser tan buena, por tus abrazos, por contar con mi opinión tantas veces, por dejarme poner a punto todo lo que he querido en el laboratorio, y por enseñarme tanto dentro de él. Gracias por llevarme a Bolonia tantas veces, y por hacer inolvidables todos nuestros viajes.

**Arancha** millones de gracias, por ponerme los pies en la tierra, por enseñarme la parte docente de esta aventura, por maravillarme cada vez que das una charla en un congreso, por dejarme dar clases prácticas en el ESPA, por tus consejos, ánimos y por habérmelo hecho pasar tan bien en los congresos.

A los tres, muchas gracias, por vuestros consejos, vuestras palabras de ánimo, porque formáis un equipo increíble y porque sé que siempre estaréis ahí.

No quiero quitarles protagonismo a las personas que me iniciaron en mi carrera investigadora. El Dr. **Juan Soliveri** de Carranza y el Dr. **José Luis Copa** Patiño, mis profesores de Microbiología en la Universidad de Alcalá, que me adoptaron como “becaria meritaria” y me dejaron “trastear” en el laboratorio durante mis últimos años de carrera. Y por supuesto a uno de mis pilares en ciencia, mi paso por el Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas UPM-INIA (CBGP), especialmente a la Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Ayllón. **M<sup>a</sup> Ángeles**, GRACIAS, por confiar en una recién licenciada y darme la oportunidad de trabajar contigo, porque todo lo que sé, es gracias a ti, por enseñarme tanto de hongos y virus, y por haber hecho lo imposible para que me quedase a tu lado, porque si he llegado hasta aquí ha sido gracias a ti. A **Nuria** (Dra. Montes Casado) mi amiga y compañera de laboratorio en el CBGP, gracias, mil gracias! Por ser como eres, por ser mi confidente y yo la tuya, por hacerme partícipe de los momentos más

importantes de tu vida, por tus regañinas constantes, por las tardes en el invernadero, por llevarme a muestrear *Arabidopsis* con tu técnica del “hule en el suelo”....(y hasta aquí puedo contar), por todo...gracias. A **Israel** (Dr. Pagán), por ser mi ejemplo a seguir, porque todo cambió de color en el laboratorio cuando regresaste de EEUU, por tu inmensa sonrisa, por nuestros viajes, porque me encanta presumir de amigo doctor, y por ser el primero en abrirme las puertas del doctorado, y sobre todo por ser mi amigo. **Antolín** mil gracias, por sacarnos una sonrisa en los momentos más tensos, por tantos desayunos, por tu ayuda en el laboratorio y facilitarme tanto mi vida allí. A **Begoña**, nuestra vecina de laboratorio, gracias por aquellos momentos y por tu sincera sonrisa cada vez que vuelvo al CBGP de visita. Gracias **Antonio** (conserje del CBGP), por no olvidarte de mí y alegrarte tanto al verme por la tele hablando de abejas. **Soledad** y **Aurora**, mil gracias por vuestros consejos y apoyo durante los casi 3 años que estuve en el CBGP. A **Manuel Rodelo** y **Manuel Guillermo** mis compis de bancada, gracias por hacérmelo pasar tan bien. A **Sara**, que aunque llegaste de las últimas fuiste muy importante. A mis **compañeros de máster**, porque fuimos un grupo muy especial, y por seguir conservándolo en la distancia (granadinos, canarios, madrileños, salamantinos...), y los que os quedasteis por el CBGP gracias por vuestros recibimientos cada vez que regreso, hacéis que me siga sintiendo como en casa... Y a todos aquellos que en algún momento hicieron que mi paso por el CBGP fuese inolvidable, incluyendo al que me robó la ultra-centrífuga echando a perder mi ensayo de 2 días.....para que luego digan que soy rencorosa ;)

Ahora sí, llega el turno de los que me han acompañado durante estos 4 años. A los que les debo todo el trabajo, a quienes han sido mis manos en tantas ocasiones y mi cabeza otras tantas. A l@s chic@s del laboratorio de patología apícola del IRIAF: Teresa Corrales, Virginia Albendea, María Gajero, Carmen Uceta, M<sup>a</sup> Carmen Rogerio, Javier Almagro, y Jesús García. A tod@s vosotr@s, no hay sitio en el universo donde quepa lo agradecida que os estoy. **Tere**, mi “compi de chapuzas”, mil gracias por todo, por cuidarme como a una hija, por solucionarme absolutamente todo fuera y dentro del laboratorio, ya sea montando una jaula o las cortinas de mi casa, por los ratos de destornillador y tuercas. Por tu decisión y disponibilidad a la hora de hacer las cosas, por quedarte horas extras en el laboratorio ayudándonos. Por tus “tranquila...” que tantas veces me han calmado, por tus “espera, espera” que te caracterizan, y porque el sonido de tus tacones me han hecho sonreír tantas veces que ya lo echo de menos. **Virgi**, mil gracias, por tus mil consejos, por nuestras charlas sobre el futuro, nuestros momentos decoración, por tus ataques de risa, tu amistad, tu dedicación trabajando, tu alegría sincera cada vez que algo bueno me pasaba, por tus puntillos cada vez que estamos de celebración, por animarme en tantas ocasiones y por conocer mi estado de ánimo solo con verme los ojos. **María G.**, muchísimas gracias por tu ayuda todo este tiempo, y por tu amistad, por nuestras charletas sobre *currupipis*, yoga, y cosas “cuquis”, por hincharme a conguitos, por tantas risas en el laboratorio, por compartir tus alegrías y tus miedos y dejar que yo hiciese lo mismo contigo, por nuestros momentos “bolsa de patatas y coca cola”, y por estar ahí siempre que lo he necesitado. **Carmen U.**, muchas gracias, por tu ayuda, por sacar las abejas de los cuadros cuando al principio me daba miedo, por tu disponibilidad para todo, por tus manualidades y postres, por tus consejos, por esa habilidad de quitarle importancia a las cosas, por tus ánimos y por hacerme reír tanto. **M<sup>a</sup> Carmen R.**, mil gracias, por preocuparte tanto por mí, por ponerte en mi lugar tantas veces y aconsejarme, por hacerme llorar de risa cuando más lo necesitaba, porque nadie lleva con tanto estilo un picotazo de abeja en los labios, por las interminables conversaciones

por teléfono, por nuestras dietas, por darle la vuelta tan fácilmente a mis preocupaciones, y por poner en mi vocabulario palabras y frases tan imprescindibles como “é o no é”.

**Javi y Jesús**, gracias por vuestra ayuda en las colmenas, por ser mi escudo anti-picotazos tantas veces, por hacérmelo pasar tan bien en el campo, por enseñarme el mítico “porta gayola” y sobre todo por nuestro concurso de “encuentra a la reina” donde declaro merecidísimo ganador a Jesús, Javi lo siento pero te quedas de segundón. Javi, a ti te debo las fotografías tan bonitas de esta tesis, eres un artista. Y a ti Jesús, tu calma en momentos tensos y tu capacidad de visión futura, gracias a ello no nos hemos arruinado con nuestro “proyecto empresarial” de cultivo de setas.

Al del resto de componentes del laboratorio, los “pre-doctores y doctores”, que en diferentes momentos han ido haciendo de estos 4 años, una experiencia inolvidable. **Cris Botías**, gracias por ser mi mentora, por tu ayuda siempre que lo necesito, por enseñarme tanto al inicio, y por seguir haciéndolo. **Tamara**, fue una alegría reencontrarnos después de varios años, mil gracias por allanarme el camino desde que empecé, por nuestros ataques de risa, por ayudarme en todo lo que he necesitado y por estar siempre al otro lado del “whatsapp”. **Sole** muchas gracias, por enseñarme tanto de genética, por ayudarme tanto, por ser la compañera de habitación ideal, por tus “pirulas” milagrosas, porque contigo guardo los mejores momentos en Marchamalo y porque no pienso volver de congreso si no es contigo!! **Miguel**, mi hermano de tesis, muchas gracias por tu ayuda cada vez que he necesitado hacer papeles en la UCM, por nuestros mensajes de mutuo ánimo, por acogerme tan bien cuando fui sola a mi primer congreso en Gran Canaria, por acordarte de mí para tantas cosas, por tu sonrisa cada vez que llegabas a Marchamalo, por tu ayuda, correcciones y consejos antes de las charlas orales, y por dejar que un puñado de locas (diosas del olimpo) te proclamasen como “Zeus” en “cá Paca”, en un congreso que ninguno olvidaremos. Gracias **Almu C.** y **Alejandro**, por vuestra ayuda e inolvidables momentos. Y por último, mil gracias **Almu Urbieto**, por ayudarme tanto, por nuestros mensajes whatsapp de audio resolviendo el mundo de las abejas, por dejarlo todo cada vez que te pido algo, y por ser un “rabo de lagartija” tan especial. **Guido**, mil gracias por tus consejos sobre taninos, y por tu ayuda en el laboratorio, ha sido un placer conocerte. Y a **Encarna Garrido** por tus correcciones.

No puedo olvidarme de mis “becarias pre-carias”: **María Benito** (Bombus), **María Buendía** (Buendi) y **Noemí Alonso** (Nosemi). No os imagináis lo importantes que habéis sido en todo este tiempo, mil gracias chicas, por dejarme enseñaros, y por ser tan buenas alumnas. Bombus, contigo es con quien he pasado más tiempo, muchas gracias por ayudarme tanto, por formar parte de mis ensayos altruistamente, por ser tan profesional, por dejarme ensayar mis charlas indefinidamente, por darme seguridad cuando me acompañaste a Pastrana y por ser mi confidente tantas veces. Buendi, gracias por confiar en mí, por darme la oportunidad de enseñarte lo que yo he aprendido, y por hacérmelo pasar tan bien en Salamanca junto a Bombus. Ojalá seas la siguiente estudiante pre-doctoral de Marchamalo. Nosemiiii, mi chica, gracias por ser tan buena y humilde, y por ser tan especial. Por tus abrazos y besos a todas horas, por seguir paso a paso todo lo que te enseñaba, y por darme el regalo de exponerlo en tu TFG de forma espectacular.

Agradecer a **todo el personal del Centro Apícola Regional de Marchamalo** (CIAPA-IRIAF), por su ayuda incondicional, y por hacerme pasar muy buenos momentos. Pero en especial al Director **José Alberto Viñuelas**, la **Dra. Amelia González**, **Alberto Sanz**, **Antoñito**, **Aitor Álvarez**, **José Luis Ramiro** por su ayuda administrativa. Al Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) por concederme esta ayuda y a la Junta de Comunidades de Castilla la Mancha. También quiero agradecer a todo el departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la UCM por su ayuda tantas veces, por adoptarme como una más en el congreso de Gran Canaria y por acudir a mis seminarios en la uni (**Sonia**, **Lupe**, **Félix**, **Ana**, **Rocío**, **Rosa** y **Julia**). A **Pilar García Palencia** por su infinita ayuda en microscopía electrónica. A las chicas de Murcia, **Pilar de la Rúa** y **Laura Jara** por tantos consejos y congresos juntas. A **Isabel y Cristina** del servicio de citometría de la Universidad de Alcalá por contar mis esporitas.

A **Antonio Nanetti** (CREA-Bolonia, Italia), y **Riccardo Cabri**, muchas gracias por vuestra hospitalidad cada vez que he estado en Bolonia, por vuestra ayuda en mis ensayos, y por enseñarme todo sobre vuestra “abejita rubia”.

Thank you so much **Dra. Yamping Chen (Judy)**, **Michele Hamilton**, **Jay Evans**, **Wenfeng Li**, **Qiang Huang**, **Miguel Corona**, and **Ryan Schwarz** for your warm welcome. Judy thank you for your kindness and for hosting me at your lab. Michele, you are the perfect technician, thank you for sharing your knowledge with me, and help. Wenfeng and Qiang thanks for making me laugh so many times and for your help. **Mónica Santín-Durán** mil gracias por facilitarme tanto mi estancia en el USDA, fuiste imprescindible, nunca podré agradecértelo tanto. **María José**, **Ignacio**, **Patricia** y **José**, gracias por todos los momentos vividos en Belstville, por nuestros paseos por Washington D.C., comidas y cenas. En especial a M<sup>a</sup> José por tantos paseos a *downtown*, y consejos sobre esta etapa de doctorado, de León tenías que ser!!

A mis compis *Runners*; **Arancha**, **Conchi**, **Almu**, **Vicente**, **Ángel**, **Tomás**, **Raúl**, **Sara**, **Antonio**, **Pablo**, **Manu**, y **tod@s los respectivos**, que haría yo sin vosotros... lo que empezó siendo un simple deporte se ha convertido en un sin fin de buenos momentos. Habéis sido y sois mi “momento desconexión”, porque me lo paso genial con vosotros, comiendo, hablando, de viaje, en un simple parque de bolas con los niños,...ah sí! y corriendo. Gracias chic@s por dejarme daros mis “*speech*” sobre abejas en los entrenos, por hacerme reír tantísimo, y llorar también y por formar juntos una familia muy especial. Sobre todo a ti Arancha, eres un ejemplo a seguir, luchadora e imparable, gracias por tirar de mí tantas veces!

Gracias a mis entrenadores **Xuso y Xepu** por cambiar tantas veces mis “*no puedo*” por un “*claro que puedes!*” y por enseñarme que con esfuerzo y disciplina se alcanzan metas tanto en el deporte como en el día a día. A **María**, **Carmen** y **Mark** gracias por cruzaros en mi vida. Y a mis **compis de yoga**, porque el que inventó el refrán “mal de muchos consuelo de tontos” tenía que haberlo continuado con “y lo a gusto que te quedas cuando lo sueltas...”, mil gracias chicas.

Gracias **Ainoa** y **Óscar**, mis amigos de toda la vida, junto con mis prim@s **Jenni**, **Sonia**, **Sara**, **Raúl**, **Mónica**, **Vane**, **Carlitos**, **Elena M.**, **Sonia M.**, a **todos los respectivos** y nuevos primillos. A **María Solís** y a toda mi familia política en especial a mi “pimo” **José**.

También quiero agradecer a todos aquellos **abuelillos de Puerto de San Vicente** que me paraban por las calles para preguntarme qué hacer con sus colmenas enfermas, aunque ello supusiese al cabo de 10 minutos, estar rodeada de 15 personas hablando de abejas durante horas, lo siento Darío.... ;)

Gracias a toda **mi familia leonesa y toledana**, pero en especial **mis padres y mis hermanas**, mis pilares en la vida, por entender este extraño mundo de la investigación, por aguantar mis viajes a todos lados, cerca o lejos de España, por soportar tener que verme por Skype largas temporadas y porque si no fuese por vuestro apoyo, esto no tendría ningún sentido. A mi **abuelo Fermín** y a **mi tío Víctor** por ser los primeros en mostrarme el mundo de las abejas. A mi tía **Mª Carmen** y **a mis primos** por preocuparse tanto por mí.

A ti **Darío**, por querer siempre lo mejor para mí, por animarme a seguir en este mundo a pesar de lo inestable que es, por empujarme a hacer viajes largos y cortos, y por hacerme confiar en mi misma y porque como dice mi canción favorita...*I have loved you for a thousand years, I'll love you for a thousand more...*





## **ÍNDICE**

|  | <b><u>Página</u></b> |
|--|----------------------|
| Cronología tesis   | 3                    |
| <b>Introducción y objetivos</b>  | 7                    |
| <b>Revisión bibliográfica</b>  | 13                   |
| 1. Nosemosis   | 13                   |
| 2. Etiología de la nosemosis   | 13                   |
| 3. Epidemiología de la nosemosis   | 16                   |
| 4. Patogenia de la nosemosis   | 18                   |
| Nosemosis A  | 19                   |
| Nosemosis C  | 19                   |
| 5. Diagnóstico de la nosemosis   | 21                   |
| 5.1. Examen macroscópico   | 21                   |
| 5.2. Examen microscópico   | 22                   |
| 5.3. Técnicas de biología molecular  | 23                   |
| 6. Control de la nosemosis   | 23                   |
| 6.1. Técnicas profilácticas  | 24                   |
| 6.2. Técnicas metafilácticas y terapéuticas de base química (origen natural y sintético)                               | 24                   |
| 6.3. Técnicas metafilácticas y terapéuticas de base molecular  | 28                   |
| <b>Capítulo I.</b>   | 33                   |
| Estudio de medidas profilácticas. Evaluación esporádica de diferentes sustancias contra esporas de <i>N. ceranae</i> . |                      |
| - MATERIAL Y MÉTODOS   | 34                   |
| - RESULTADOS   | 38                   |
| - DISCUSIÓN  | 43                   |
| <b>Capítulo II.</b>  | 49                   |
| Estudio con sustancias de origen natural y sintético frente a Nosemosis C en <i>Apis mellifera</i> .                   |                      |
| <b>A. Selección de sustancias</b>  | 51                   |
| <b>B. Ensayos de laboratorio:</b>  | 53                   |
| B.1) Ensayo de toxicidad y dosis máxima consumida  | 54                   |
| - MATERIAL Y MÉTODOS   | 54                   |
| - RESULTADOS   | 61                   |



|  |         |
|--|---------|
| - DISCUSIÓN  | 70      |
| B.2) Ensayo de eficacia frente a <i>N. ceranae</i>   | 73      |
| - MATERIAL Y MÉTODOS   | 73      |
| - RESULTADOS   | 76      |
| - DISCUSIÓN  | 79      |
| C. Ensayo de campo: Eficacia de diferentes tratamientos frente a <i>N. ceranae</i> y su efecto en la colonia de abejas | 82      |
| - MATERIAL Y MÉTODOS   | 83      |
| - RESULTADOS   | 92      |
| - DISCUSIÓN  | 106     |
| <br>Capítulo III.  | <br>113 |
| Nuevas alternativas metafilácticas y terapéuticas de base molecular  |         |
| A) Búsqueda de genes diana mediante el análisis de expresión génica de <i>N. ceranae</i> en la célula hospedadora      | 115     |
| - MATERIAL Y MÉTODOS   | 116     |
| - RESULTADOS   | 120     |
| - DISCUSIÓN  | 127     |
| B) Control de la nosemosis mediante el silenciamiento de genes diana en <i>N. ceranae</i> .                            |         |
| Tratamiento con ARN de interferencia   | 129     |
| - MATERIAL Y MÉTODOS   | 130     |
| - RESULTADOS   | 137     |
| - DISCUSIÓN  | 145     |
| <br>Conclusiones   | <br>151 |
| Resumen  | 155     |
| <i>Summary</i>   | 159     |
| Referencias bibliográficas   | 162     |
| Anexo I. Capítulo I, histogramas citometría de flujo   |         |
| Anexo II. Publicaciones científicas  |         |

## CRONOLOGÍA DE LA TESIS

|            |                      | 2012   |        | 2013   |        |        |        |                |        |        |        |        |        |        |        |
|------------|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|            |                      | nov-12 | dic-12 | ene-13 | feb-13 | mar-13 | abr-13 | may-13         | jun-13 | jul-13 | ago-13 | sep-13 | oct-13 | nov-13 | dic-13 |
| Cap II.B   | Ensayo Laboratorio   |        |        |        |        |        |        |                |        |        |        |        |        |        |        |
| Cap II.C   | Ensayo Campo         |        |        |        |        |        |        |                |        |        |        |        | T1     | T2     |        |
| Cap. I     | Ensayo desinfección  |        |        |        |        |        |        |                |        |        |        |        |        |        |        |
| Cap.III A  | Ensayo expresión     |        |        |        |        |        |        |                |        |        |        |        |        |        |        |
| Cap. III B | Ensayo dsRNA         |        |        |        |        |        |        |                |        |        |        |        |        |        |        |
|            | Estancia USDA (EEUU) |        |        |        |        |        |        |                |        |        |        |        |        |        |        |
|            | Estancia Bolonia     |        |        |        |        |        |        | glucosinolatos |        |        |        |        |        |        |        |

|            |                      | 2014   |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |                        |  |
|------------|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------------------|--|
|            |                      | ene-14 | feb-14 | mar-14 | abr-14 | may-14 | jun-14 | jul-14 | ago-14 | sep-14 | oct-14 | nov-14 | dic-14 |                        |  |
| Cap II.B   | Ensayo Laboratorio   |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        | ANÁLISIS<br>RESULTADOS |  |
| Cap II.C   | Ensayo Campo         |        |        | T3     | T4     |        |        |        |        | miel   |        |        |        |                        |  |
| Cap. I     | Ensayo desinfección  |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |                        |  |
| Cap.III A  | Ensayo expresión     |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |                        |  |
| Cap. III B | Ensayo dsRNA         |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |                        |  |
|            | Estancia USDA (EEUU) |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |                        |  |
|            | Estancia Bolonia     |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |                        |  |

|            |                      | 2015   |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        | 2016   | 2017 |
|------------|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------|
|            |                      | ene-15 | feb-15 | mar-15 | abr-15 | may-15 | jun-15 | jul-15 | ago-15 | sep-15 | oct-15 | nov-15 | dic-15 | ene-16 | →    |
| Cap II.B   | Ensayo Laboratorio   |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |      |
| Cap II.C   | Ensayo Campo         |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |      |
| Cap. I     | Ensayo desinfección  |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |      |
| Cap.III A  | Ensayo expresión     |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |      |
| Cap. III B | Ensayo dsRNA         |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |      |
|            | Estancia USDA (EEUU) |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |      |
|            | Estancia Bolonia     |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |      |

### Leyenda:

- T1, T2, T3, T4: puntos de muestreo capítulo II. C, ensayo campo.
- Glucosinolatos: capítulo II.B, ensayo laboratorio (viaje Bolonia, CREA).
- Miel: recogida de miel, capítulo II.C, ensayo campo.
- Laboratorio USDA: estancia EEUU, capítulo III.B (dsRNA).



# INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS







## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En España, la apicultura es una actividad ancestral y muy arraigada en nuestra cultura, como demuestran las pinturas rupestres del período Paleolítico (7.500 años) encontradas en la Cueva de la Araña (Valencia) que recogen escenas de la recolección de la miel. Esta actividad consiste en la cría y manejo de las abejas para el aprovechamiento de los productos derivados de la colmena, tales como miel, polen, cera, jalea real, propóleos y veneno (apitoxina), productos todos muy apreciados y beneficiosos para el hombre, así como utilizados en la industria farmacéutica.

El papel de las abejas es fundamental en la conservación del medio ambiente y en la polinización de cultivos, aunque a la abeja melífera (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758) se la conoce principalmente por su capacidad de elaborar miel. Tiene un cierto impacto económico en nuestro país, por el alto número de profesionales y el hecho de que España es el país europeo que mayor producción de miel genera (30.731 Tm., datos de MAGRAMA 2015).

España también es el primer productor Europeo de los otros productos apícolas, como son el polen y la cera. Cuenta con el mayor censo apícola de la Unión Europea, alrededor de 2,5 millones de colmenas, más del 15% del total del censo apícola registrado de la Unión Europea de los 28 países (datos Comisión Europea y estadísticas de Magrama 2015). Además el 80% de las colmenas registradas del censo español pertenecen a apicultores profesionales (apicultores con más de 150 colmenas).

Todo esto convierte a España en una gran potencia mundial en lo que a apicultura se refiere, ocupando el octavo puesto como productor de miel. Debemos tener presente que, además del valor de sus producciones (miel, polen, jalea real, cera, etc.), las colonias de abejas tienen un importante papel como polinizadores, tanto de plantas cultivadas como de especies silvestres. La función polinizadora adquiere una mayor importancia si tenemos en cuenta que en muchas zonas son los únicos insectos que realizan esta función y que también posibilitan el aprovechamiento de zonas agrarias marginales, que no son susceptibles de otro tipo de usos.

Las poblaciones de abejas melíferas en todo el mundo están sufriendo un descenso desde principio del siglo XXI, lo que ha generado una gran preocupación en la sociedad y en las autoridades sanitarias durante los últimos años. A este fenómeno de pérdida de colonias de abejas en España se le ha denominado “Síndrome de Despoblamiento de Colmenas” (SDC), caracterizado por una disminución drástica del número de abejas de una colmena sin causa aparente.

Desde el principio han sido muchas y variadas las hipótesis acerca de las causas que podrían provocar este fenómeno. Hoy en día, sigue sin haber un consenso, pero se acepta que la muerte de colonias es un fenómeno multifactorial donde los patógenos juegan un papel clave en este proceso, al igual que la exposición a insecticidas. Los factores que se han visto implicados en la muerte de colmenas son muy variados, entre los que se encuentran los ácaros parásitos, los estados de malnutrición, la presencia y efecto de los hongos patógenos, los tóxicos medioambientales, los virus, etc.

La reacción de los apicultores ante esta situación ha generado una actitud de un mayor seguimiento y cuidado de sus colmenas, intentando paliar las malas condiciones de alimentación o reduciendo el estrés productivo, pero no ha sido suficiente.

En los estudios más recientes se constata un aumento general en la prevalencia de patógenos en las abejas, datos que hay que tomar con precaución. No hay que olvidar que, debido a los estudios impulsados tras la aparición de SDC, han mejorado significativamente las técnicas de detección de estos parásitos, por las técnicas moleculares de última generación.

En los años 2004 y 2005 el equipo del Centro Apícola de Marchamalo (IRIAF-CIAPA), en colaboración con el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, comenzó a tener noticia de esta pérdida masiva de colonias sin etiología clara en la Península. Fue este grupo el que detectó por primera vez en Europa *Nosema ceranae* en 2004 lo que ha dado lugar a numerosas investigaciones que a día de hoy han demostrado su capacidad patógena, siendo capaz de matar una colonia.

Tras diez años del descubrimiento de este microsporidio en la abeja europea y un intenso debate sobre su papel en la muerte de colonias, ya se acepta por la comunidad científica que la nosemosis tipo C tiene un efecto devastador en las colonias de abejas. Así se reconoce en programas como Epilobee (2014), y por las autoridades españolas (MAGRAMA). Dada la ausencia de medidas de control es prioritario evaluar compuestos eficaces y compatibles con esta ganadería, tanto para asegurar la limpieza del material como para el tratamiento de las abejas. Debido al origen sanitario de este proceso es imprescindible la incorporación de veterinarios a los equipos multidisciplinares, para facilitar el control integral de los patógenos en las explotaciones apícolas, asegurando la calidad y seguridad de los productos, manteniendo la salud y el bienestar de las abejas y protegiendo el medioambiente.

Para el control de las nosemosis, el equipo del Centro de investigación apícola y agroambiental de Marchamalo (CIAPA) ha seguido varias líneas de trabajo dirigidas al estudio de medidas profilácticas, metafilácticas y terapéuticas. Actualmente, el método de control más eficaz conocido es la fumagilina, sin embargo, desde 2008 no está autorizada en la Unión Europea para su uso apícola, por no tener establecido su límite máximo de residuos (LMR) en miel. La situación actual es una total ausencia de sustancias autorizadas para el tratamiento de la nosemosis en Europa (salvo autorizaciones excepcionales de la fumagilina en algún estado miembro). Esto pone en riesgo muchas explotaciones apícolas en España y en otros países de Europa meridional. Por ello los apicultores a los que se les diagnostica la presencia de estos agentes en sus colonias (mayoritariamente *N. ceranae*), solo pueden mantener las colmenas en el mejor estado de bienestar posible mediante una buena alimentación y adecuadas técnicas de manejo.

En esta memoria los compuestos naturales han sido considerados como la mejor alternativa para esta ganadería en el control de *N. ceranae*, además de estar la mayoría de ellos incluidos en el anexo II de la normativa vigente (Reglamento CEE 2377/90), donde se establecen los LMR que pueden encontrarse de estas sustancias en productos de consumo humano.

También se incluyen en esta memoria la evaluación de productos higiénicos sanitarios para desinfectar el material apícola y la posibilidad de aplicar innovadoras técnicas moleculares que abren

un nuevo campo de investigación, más personalizado al control de este patógeno a través del bloqueo de sus rutas metabólicas.

La importancia de dotar al sector de alternativas eficaces y económicas, como el desarrollo de tratamientos veterinarios y herramientas que ayuden a la prevención de la nosemosis es el objetivo general de esta memoria, definido como:

- Desarrollo de nuevas medidas profilácticas, metafilácticas y terapéuticas de base química o molecular en *A. mellifera iberiensis* contra el microsporidio *N. ceranae* en condiciones de laboratorio y de campo.

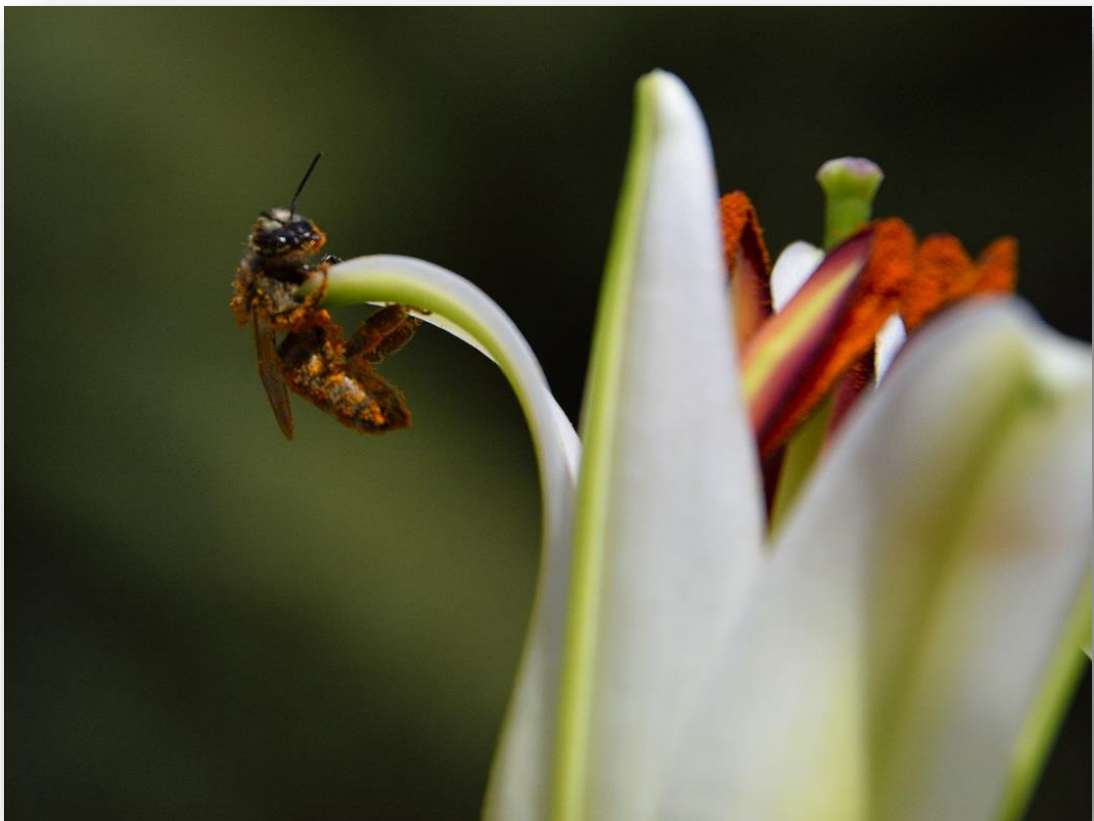
Del objetivo principal se formularon los siguientes objetivos específicos:

- Estudio de sustancias aplicables en el material apícola para el control higiénico sanitario de las esporas de *N. ceranae*.
- Estudio de sustancias eficaces contra *N. ceranae*, que ayuden a la formulación de nuevos tratamientos veterinarios que permitan el control de la enfermedad.





# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA







## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1. LA NOSEMOSIS

Las nosemosis son un grupo de enfermedades de las abejas causadas por microsporidios del género *Nosema*. Son parásitos unicelulares y eucariotas que dependen de una célula hospedadora para desarrollar y completar su ciclo biológico (Wittner y Weiss, 1999). Constituyen un grupo de organismos muy heterogéneo y en constante adaptación, contando actualmente con más de 1200 especies descritas, distribuidas en 150 géneros (Keeling y Fast, 2002). La clasificación de los microsporidios ha estado siempre muy discutida. Actualmente se les incluye dentro del reino de los hongos (Adl y col., 2005, 2012; Lee y col., 2008). Son capaces de infectar un amplio rango de hospedadores, desde protistas hasta seres humanos, aunque la mayoría son parásitos de invertebrados (Becnel y Andreadis, 1999).

Dentro de los microsporidios se han descrito dos especies del género *Nosema* que parasitan a las abejas melíferas, denominadas *Nosema apis* y *Nosema ceranae* causantes de la enfermedad denominada **nosemosis**.

*Nosema apis* (Zander, 1909) parasita principalmente a la abeja europea (*Apis mellifera*), mientras que *N. ceranae* (Fries y col., 1996) se describió inicialmente en la abeja asiática (*Apis cerana*), aunque ambos organismos pueden parasitar cualquiera de las dos especies de abejas (Martín-Hernández y col., 2007; Paxton y col., 2007; Copley y col., 2012; Botías y col., 2013a; Charbonneau y col., 2016). Ambas especies de microsporidios producen una enfermedad que afecta a la viabilidad de las colmenas conocida como nosemosis. Sin embargo, cada especie presenta un cuadro clínico muy diferente, por lo que actualmente se considera que producen dos enfermedades: nosemosis A producida por *N. apis* y nosemosis C, por *N. ceranae* (COLOSS, 2009).

### 2. ETIOLOGÍA DE LA NOSEMOSIS

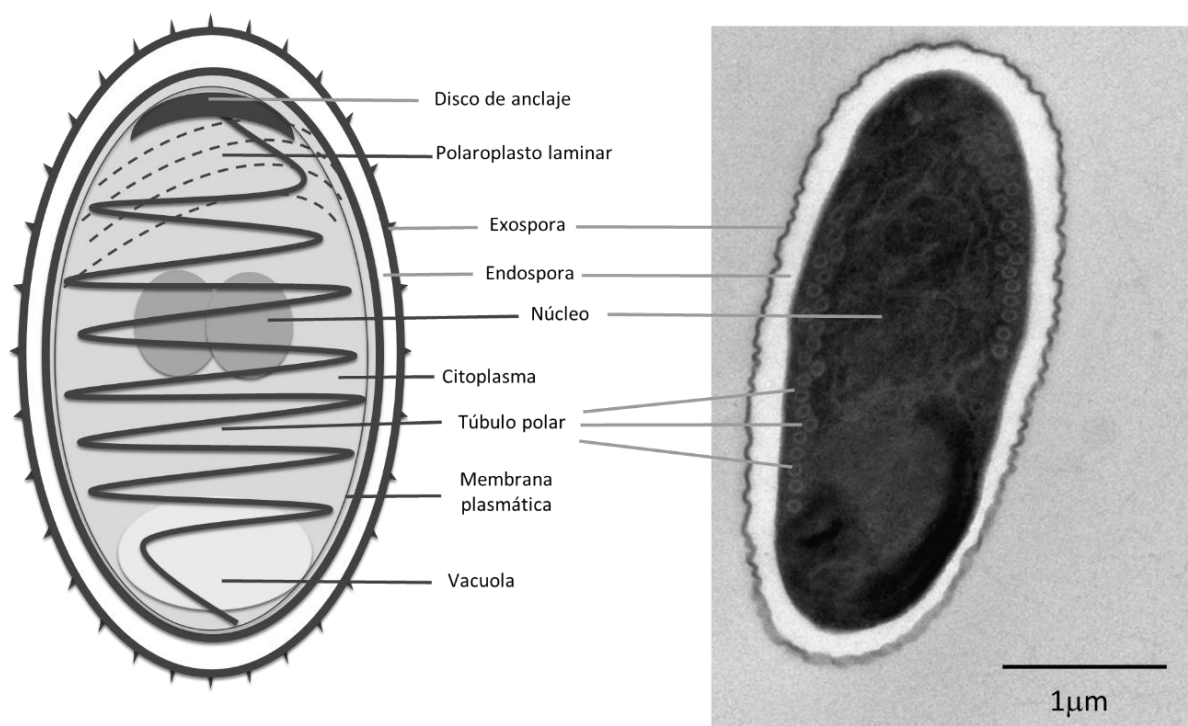
Como se ha mencionado anteriormente, dentro del taxón *Microsporidia* y pertenecientes al súper grupo *Opisthokonta* se encuentran las especies del género *Nosema* (Adl y col., 2005). Son hongos unicelulares y parásitos intracelulares obligados muy especializados que invaden las células epiteliales del ventrículo (estómago) de la abeja melífera (Bailey, 1955).

*Nosema apis* y *N. ceranae* producen esporas en la última fase de su ciclo y son eliminadas al medio ambiente por las heces (Gilliam y Shimanuki, 1967). Las esporas son por tanto formas de resistencia encargadas de la transmisión de la enfermedad. Mediante la diferenciación morfológica de la espora se pueden identificar ambos microsporidios. En ambas especies las esporas son refringentes, de forma ovalada pero de diferente tamaño. Las esporas de *N. apis* (6 x 3 µm; Zander y Böttcher, 1984 citado por Fries y col., 2013) son aproximadamente 1 µm más largas que las de *N. ceranae* (4,7 x 2,7 µm; Fries y col., 1996). Al observar estas esporas mediante microscopía electrónica se distinguen

principalmente dos membranas: la más externa (exospora) está formada por proteínas que no permiten el paso de la luz, mientras que la capa interna (endospora) se compone de quitina y permite el paso de la luz. Ambas capas le confiere a la espora gran resistencia fuera del hospedador frente a condiciones climáticas adversas.

En la parte anterior de la espora, se distinguen dos estructuras: el disco de anclaje, donde comienza el tubo polar (más corto en *N. ceranae*), y el diplocarion (doble núcleo). El filamento o túbulo polar rodea toda la espora mediante 20 y 23 vueltas en *N. ceranae* o con más de 30 vueltas en *N. apis* (Fries y col., 1996). También se aprecia una vacuola con material flocular en la parte posterior (figura 1). Se denomina esporoplasma al material que envuelve ambas partes.

**Figura 1. Diagrama de la estructura interna de una espora de *N. ceranae* madura bi-nucleada.** A la izquierda, un esquema de cómo se distribuye el filamento polar enrollado alrededor de los orgánulos. A la derecha, la imagen obtenida por microscopía electrónica de un corte longitudinal de una espora. En él se aprecian la endospora, exospora, las vueltas del filamento polar y el núcleo. Imágenes de microscopía extraídas de Higes y colaboradores., 2007. Fuente: original.



Tras ser ingeridas las esporas por las abejas invaden en primer lugar el epitelio de la parte posterior del ventrículo, donde comenzarán a germinar debido al ambiente básico creado por los jugos gástricos (Bailey, 1955). El mecanismo utilizado, se basa en la eversión del filamento polar de la espora durante la germinación. El túbulo polar atraviesa la membrana de una célula epitelial del ventrículo, e inyecta en el citoplasma el esporoplasma binucleado (Larsson, 1986). A continuación, se produce la fusión de los dos núcleos, dando lugar a la fase de merogonia, donde el núcleo se dividirá asexualmente formando los merontes. En *N. apis* se han descrito dos ciclos merogónicos, siendo aún

desconocido el número de ciclos de merogonia para *N. ceranae*. Los merontes se dividen para dar lugar a los esporontes sobre los que se evidencian depósitos de queratina que formarán parte de la futura exospora. Los esporontes se vuelven a dividir para formar los esporoplastos, a partir de los cuales se generan las esporas de primera generación, caracterizadas por presentar una fina endospora. Estas esporas vuelven a germinar dentro de la misma célula o en las células adyacentes, favoreciendo la transmisión. Por el contrario, las esporas procedentes de la segunda generación (esporas medioambientales) tienen una endospora más gruesa. En el caso de *N. apis*, las esporas maduras comienzan a producirse en grandes cantidades transcurridos tres días después de la infección. Igualmente en el caso de *N. ceranae* se ha descrito que a los tres días post-infección ya se observan esporas maduras (Higes y col., 2008).

Las células parasitadas con gran cantidad de esporas acabarán rompiéndose y liberando las esporas a la luz del tubo digestivo, que serán expulsadas al exterior con las heces. Gracias a este mecanismo pueden producirse simultáneamente autoinfecciones y nuevas infecciones. La presencia de esporas vacías dentro de las células epiteliales indica que el parásito completa su ciclo dentro del hospedador (Fries y col., 1996; Higes y col., 2009; Higes y col., 2010b). En un tiempo medio de 2 semanas, la infección se habrá extendido por todo el epitelio.

En cuanto a la estructura molecular el ADN ribosómico (ADNr) está organizado en unidades repetidas en tándem. Es un marcador molecular de primera elección a la hora de diferenciar genéticamente unas especies de otras. Pero existen casos en los que las copias de ADNr no son iguales dentro de una misma especie, como son *N. apis*, *N. bombi*, *N. bombycis*, *N. granulosus* y *N. ceranae* (Gatehouse y Malone, 1998; O'Mahony y col., 2007; Sagastume y col., 2011; Chen y col., 2013; Krebes y col., 2014). Cada unidad está formada por el gen de la subunidad pequeña (SSU), un espaciador transcrito interno (ITS), la subunidad 5S y el gen de la subunidad grande (LSU). Estas unidades se encuentran separadas por un espaciador intergénico (IGS). En el caso de *N. ceranae* la disposición es diferente a otras: al comienzo se encuentra la subunidad 5S, con una curiosa orientación transcripcional inversa, seguidamente el espaciador intergénico (IGS), el gen de la SSU, ITS y finalmente la LSU (Huang y col., 2008).

En algunos microsporidios el ITS es un buen marcador de identificación tanto inter como intraespecífico dada su longitud y su capacidad de acumulación de mutaciones aleatorias. Sin embargo, este marcador no es útil en *N. ceranae* ya que su secuencia es muy corta y no alberga una variabilidad significativa (Sagastume y col., 2011). En este caso el IGS se estudió como alternativa, pero su gran variabilidad junto con evidentes procesos de recombinación (tanto en el espaciador, como en la SSU) descartó el rDNA como marcador para realizar estudios de filogenias moleculares (Sagastume y col., 2011). Esta heterogeneidad en los genes ribosómicos también ha sido observada en *Nosema bombi* (Tay y col., 2005; O'Mahony y col., 2007), *N. apis* (Gatehouse y Malone, 1998) y *N. granulosus* (Krebes y col., 2014).

La diversidad del ADN ribosómico en *N. ceranae* complica la identificación o diferenciación de cepas con diferentes orígenes geográficos o patogenicidad, y el establecimiento de relaciones filogenéticas entre cepas, por lo que se hace necesaria la búsqueda de otros marcadores genéticos, que idealmente deberían ser de copia única (Fries, 2010; Sagastume y col., 2011, 2014; Hatjina y col.,

2011). A lo largo de los últimos años se estudiaron varios marcadores de estas características y todos ellos describieron una alta heterogeneidad en las secuencias de *N. ceranae*, indistintamente del marcador utilizado (Gómez-Moracho y col., 2014, 2015; Hatjina y col., 2011; Sagastume y col., 2016; Roudel y col., 2013). Este alto grado de variabilidad genética junto con desequilibrio de ligamiento, la diversidad genética y gran dificultad para elaborar filogenias moleculares apuntan claramente a un proceso sexual oculto en el ciclo de *N. ceranae* (Sagastume y col., 2016).

### 3. EPIDEMIOLOGÍA DE LA NOSEMOSIS

Los dos agentes causantes de la nosemosis en abejas son morfológica y funcionalmente similares, pero causan diferentes cuadros clínicos. Desde el descubrimiento de *N. ceranae* en *Apis mellifera* en el 2005 de manera simultánea en España (Higes y col., 2006) y Taiwán (Huang y col., 2005) se ha considerado que la nosemosis es una pandemia a nivel mundial. *N. ceranae* es la causante de la nosemosis C, tiene una elevada prevalencia en todo el planeta (Paxton, 2007; Klee y col., 2007; Chen y col., 2008; Giersch y col., 2009; Medici y col., 2011; Yoshiyama y Kimura, 2011; Chaimanee y col., 2011; Martín-Hernández y col., 2012; Gómez-Moracho y col., 2015; Emsen y col., 2015) y se ha demostrado su efecto letal sobre las colonias de abejas (Higes y col., 2008c; 2009a; Bekele y col., 2015; Betti y col., 2014; Wolf y col., 2014). Este parásito causa infecciones también en otras especies del género *Apis* (Suwannapong y col., 2010; Botías y col., 2012c; Plischuk y col., 2009; Graystock y col., 2013), y abejas solitarias, lo que muestra su amplio rango de hospedador (Ravoet y col., 2014).

Por otra parte *N. apis* por su parte es causante de la nosemosis A, con cuadros clínicos poco recurrentes, muy localizados y en condiciones muy específicas. Se considera que a pesar de ser una de las enfermedades más conocidas y extendidas de las abejas (Fries, 2010; Higes y col., 2010a; Traver y Fell, 2011; Medici y col., 2012; Martínez y col., 2012; Higes y col., 2013a), se mantiene en equilibrio con su hospedador no llegando a eliminar a la colonia en condiciones normales y sanitariamente controladas.

El hecho de que *N. ceranae* se describiese en la abeja europea hace tan solo una década, y su relación con el SDC (Higes y col., 2006, 2013a; Martín-Hernández y col., 2007; Klee y col., 2007; Paxton y col., 2007; Budge, 2008; Antúnez y col., 2009; Suwannapong y col., 2010; Botías y col., 2012c; Gómez-Moracho y col., 2015), hace pensar que su rápida invasión y extensión originó una epidemia de consecuencias catastróficas a principios del siglo veintiuno.

Se ha generado cierta controversia en relación al posible desplazamiento de *N. apis* por *N. ceranae* (Gisder y col., 2010; Martín-Hernández y col., 2012; Milbrath y col., 2015), ya que el incremento de la prevalencia de *N. ceranae* y la baja prevalencia de *N. apis*, en esta última década, sugerían esta hipótesis (Klee y col., 2007; Traver y Fell, 2011). No obstante la prevalencia de *N. apis* se ha mantenido, ya que las diferencias climáticas o estacionales en el desarrollo óptimo de ambos microsporidios es evidente (Malone y col., 2001; Martín-Hernández y col., 2009; Higes y col., 2010b; Chen y col., 2012; Pacini y col., 2016). Sin embargo estudios realizados en condiciones de laboratorio con infecciones mixtas, sugieren que *N. ceranae* tiene mayor capacidad replicativa, siendo capaz de desplazar intracelularmente a *N. apis* (Williams y col., 2014; Natsopoulou y col., 2015).



La diferente **termo-tolerancia** de ambas especies podrían ser la explicación del característico curso de la infección y al aumento de la mortalidad en las colonias que se han descrito en el centro y sur de Europa durante los últimos años. En estos casos la nosemosis lleva asociada la presencia de *N. ceranae* y no se da sólo en primavera sino durante todo el año (Higes y col., 2005; Higes y col., 2006; Imdorf y col., 2006; Higes y col., 2007a; Paxton y col., 2007). Martín-Hernández y colaboradores (2012) describen que en las condiciones climatológicas de España, *N. ceranae* es siempre más prevalente que *N. apis* (tanto a nivel del territorio español, de colmena y de castas).

El patrón epidemiológico que se describe en textos y publicaciones más antiguos sobre la nosemosis, con una clara **estacionalidad** se corresponde a la infección por *N. apis*. La nosemosis se relacionaba con bajos niveles de prevalencia durante el verano, un pequeño pico en otoño y una subida lenta durante el invierno que se agudizaba en primavera coincidiendo con el comienzo de la cría. Esta estacionalidad sigue observándose en colmenas de centro Europa, en las que *N. apis* todavía es más prevalente. Esto podría ser debido a la pérdida de capacidad de germinación de las esporas de *N. ceranae* a bajas temperaturas (Forsgren y Fries, 2010), lo que evitaría su proliferación en las colonias durante el invierno, temperaturas más favorables a *N. apis*.

De forma contraria, en las colmenas españolas donde la mayoría de las infecciones son causadas por *N. ceranae*, los valores de prevalencia de los últimos años durante el verano han ido incrementando hasta tal punto, que el parásito puede detectarse en cualquier época del año. Su resistencia a la desecación y el calor (Fenoy y col., 2009; Martín-Hernández y col., 2009) explican su adaptabilidad a las altas temperaturas (Martín-Hernández y col., 2007; Gisder y col., 2010a; Bernal y col., 2011).

Las tres castas de abejas adultas de la colmena (obreras, reinas y zánganos) son susceptibles a la infección tanto por *N. apis* como por *N. ceranae*. La **transmisión** de la enfermedad de unas abejas a otras se realiza de forma horizontal a través de la ingesta de esporas contenidas en el alimento o el agua, a través de las tareas de limpieza que realizan las obreras (entre las que se encuentra la eliminación de heces) y mediante trofalaxia entre abejas de la misma colonia o entre colonias. Además se ha visto que la acumulación de miel (que puede tener esporas), o de abejas muertas por la infección que quedan dentro de la colmena y la contaminación fecal de la cera, principalmente de los panales utilizados para la cría, son focos de infección de *N. apis* (Bailey, 1955; Morgenthaler, 1963). Todas estas formas de transmisión se han confirmado posteriormente para *N. ceranae* (Paxton y col., 2007; Higes y col., 2009b; Smith, 2012). También se ha observado que las egagrópilas de los abejarucos (*Merops apiaster*) y el polen corbicular pueden mantener las esporas infectivas (Higes y col., 2008a, 2008b).

El manejo de las colonias realizado por el apicultor (Malone, 2001) y los movimientos migratorios entre zonas climáticas distintas para conseguir el mayor rendimiento de las colonias, potencia el contacto entre apiarios (Van Engelsdorp y col., 2010) facilitando la dispersión de la enfermedad. De esta manera, colonias sanas pueden fácilmente infectarse por compartir las mismas fuentes de alimentos, o por robar las reservas de alimento en colmenas débiles, ya que como se ha mencionado con anterioridad la miel y el polen corbicular podrían ser fuentes de infección (Higes y col., 2008a; Cox-Foster y col., 2007; Giersch y col., 2009).



Aunque siempre se ha considerado una enfermedad de la abeja adulta, recientes descubrimientos, en condiciones de laboratorio, demuestran que *N. ceranae* es capaz de infectar larvas de *A. mellifera* de manera puntual (Eiri y col., 2015). Otros autores indican que en ciertas circunstancias, esto también ocurre de forma natural en colmenas altamente parasitadas (Urbietta y col., 2016). Este resultado podría tener alguna relación con estudios anteriores en los que detectaron ADN de *N. ceranae* en jalea real procedente de colonias que estaban naturalmente infectadas con el microsporidio (Traver y Fell, 2012).

Otro tipo de transmisión de la enfermedad es de forma vertical o sexual. Un reciente estudio afirma la presencia de esporas de *N. ceranae* en el semen de zánganos, y confirman el desarrollo de la infección en reinas que habían sido artificialmente inseminadas con él, aunque las esporas no fueron transmitidas verticalmente a los huevos (Robert y col., 2015).

#### 4. PATOGENIA DE LA NOSEMOSIS

Los libros de texto más antiguos describen la nosemosis ocasionada por *N. apis*. En la actualidad *N. ceranae*, a pesar de originar los mismos daños en la abeja, muestra una patología diferente a la de *N. apis*. En el 2009, el grupo Coloss, compuesto por investigadores de todo el mundo, decidió adaptar la terminología que hasta entonces se había estado usando para esta enfermedad. De manera que se denominó nosemosis A la originada por *N. apis* y nosemosis C la originada por *N. ceranae* (Coloss, 2009), como ya queda recogido en los libros de texto más actuales (Deplazes y col., 2016).

Algunos autores propusieron un **efecto sinérgico** entre *Nosema* y **otros patógenos** de las abejas como los virus (Bailey y Ball 1991; Benjeddou y col., 2001). Pero hoy en día los mecanismos de asociación siguen sin estar claros. En algunos estudios parece existir tal efecto entre *N. ceranae* y el virus de las alas deformadas (DWV, *deformed wings virus*) (Zheng y col., 2015). Sin embargo, Costa y colaboradores (2011) proponen una posible competición entre ambos patógenos por los recursos dentro de la célula hospedadora. Resultados que confirmaron Doublet y colaboradores (2015) donde *N. ceranae* inhibe el desarrollo de DWV, siempre y cuando sea *N. ceranae* el que primero se haya establecido en el hospedador, mientras que en sentido inverso, siendo DWV el primero en establecerse, no inhibe el desarrollo de *N. ceranae*, proponiendo una asimetría en esta competición.

La nosemosis acaba provocando una disminución de la actividad de la colonia debido a la constante pérdida de abejas al morir las más viejas por estar más parasitadas (Jack y col., 2016). Una consecuencia de eso es la menor entrada de alimento en la colmena y menor producción de miel, generando importantes pérdidas económicas (Martín-Hernández y col., 2007a; Higes y col., 2009a, 2010b; Botías y col., 2013a, b; Simeunovic y col., 2014).



### Nosemosis A

La nosemosis A es la enfermedad provocada por *N. apis*. La infección por *N. apis* puede pasar desapercibida, ya que frecuentemente no muestra signos aparentes de la enfermedad, incluso cuando el nivel de infección debiera ser suficiente para afectar a la producción de miel (Hornitzky, 1985; Anderson y Giacon, 1992; Fries y col., 1996). La mayor prevalencia de abejas infectadas con *N. apis* está descrita para los meses de otoño, siendo durante el invierno cuando en las colonias infectadas pueden aumentar la mortalidad o colapsar (Bailey, 1955; Hornitzky, 2005, 2008; Forsgren y Fries, 2013).

Se han descrito brotes agudos de la enfermedad al principio de la primavera, donde se observan manchas fecales marrones de olor ácido peculiar sobre los cuadros y en la entrada de la colmena (Bailey, 1967 citado por OIE, 2013a). En estos casos es frecuente observar un elevado número de abejas débiles o muertas en la entrada de la colmena o sus proximidades que presentan un abdomen aumentado de tamaño o encogido (Gómez, 1998). Las abejas que están delante de la piquera, intentan regresar utilizando la vegetación. Lo que indica la presencia de abejas debilitadas incapaces de volar y regresar a la colmena.

A nivel individual, *N. apis*, genera cambios en la función celular de diferentes tejidos en la abeja, que conlleva a un fallo funcional del órgano. Además, se puede observar la variación de color que provoca la infección en el ventrículo, el cual aparece de color marrón en las abejas sanas, mientras que en las abejas infectadas adquiere un color blanquecino. El tejido ventricular infectado es más frágil en su manipulación y tiene un aspecto hinchado (Bailey, 1981; Liu, 1984). La malnutrición causada por la dificultad en la digestión de nutrientes, como por ejemplo la digestión de las proteínas, provoca anemia (Gilliam y Shimanuki, 1967) y atrofia en las glándulas hipofaríngeas (Tomaszweska, 1979). Este fallo en el metabolismo celular genera una disminución en la síntesis de energía, debilidad en las abejas y dificultad en la capacidad de vuelo (Moeller, 1978). En la abeja reina se ha observado que puede atrofiar las ovariolas hasta producir esterilidad. Por último se ha descrito que *N. apis* es capaz de comprometer la fertilidad en zánganos (Peng y col., 2015).

A nivel de colonia, un número elevado de abejas adultas afectadas con nosemosis A, repercute en la pérdida de abejas durante el invierno y al inicio de la primavera. Esta mortalidad se debe, entre otras cosas, a la falta de reservas acumuladas en el cuerpo graso (Lotmar, 1939). La nosemosis A disminuye la producción de miel y jalea real, esto se ve reflejado en un inadecuado desarrollo de las larvas y cuidado de las reinas (Wang y Moeller, 1969 citado por Alaux y col., 2010; Liu, 1990). Sin embargo en las condiciones ambientales de nuestro país, la prevalencia es muy baja, de forma que la acción patogénica a nivel de colonia es menor y en raras ocasiones lleva a la muerte de la colonia (Botías y col., 2012b; Martín-Hernández y col., 2012).

### Nosemosis C

La Nosemosis C está provocada por la infección de *N. ceranae* a las abejas. Se caracteriza por su presencia durante todo el año, y por la ausencia de signos clínicos relacionados con la infección por *N. apis* como depósitos fecales o el abdomen dilatado (Martín-Hernández y col., 2007; Tapaszki y col., 2009). El daño que provoca *N. ceranae* a nivel individual está ampliamente admitido, pero la

demostración de los postulados de Koch ha dejado claro su papel como agente infectocontagioso (Higes y col., 2008).

El daño que *N. ceranae* provoca en las abejas a nivel individual se ha estudiado mediante infecciones experimentales realizadas en condiciones de laboratorio (Higes y col., 2007a). Los resultados obtenidos por Higes y colaboradores (2007a) muestran a través de cortes ultra finos observados por microscopia electrónica, como el parásito invade los pliegues de las células basales del epitelio ventricular. Y a los tres días post-infección observaron esporas maduras dentro de estas células, sugiriendo que el ciclo se había completado. Gisder y Genersch (2015) han desarrollado recientemente un medio de cultivo con la línea celular IPL-LD 65Y (células de lepidóptero), con el que observaron las etapas del ciclo celular de *N. ceranae* observando resultados similares.

Numerosos estudios han analizado la respuesta de defensa de *Apis mellifera* ante una infección con *N. ceranae*. Se ha demostrado que *N. ceranae* es capaz de bloquear parcialmente los mecanismos de defensa humoral y celular, dirigiendo el metabolismo nutricional a una mayor disponibilidad de nutrientes a favor del patógeno, disminuyendo sus defensas (Holt y col., 2013; Vidau y col., 2014; Mayack y col., 2015; Kurze y col., 2016). Durante la infección disminuye la expresión de la hormona vitelogenina (Antúnez y col., 2009; Golbrisch y col., 2013) que participa en la síntesis de jalea real (Amdam y col., 2003a), promueve la inmunidad, actúa en la respuesta a estrés y longevidad de la abeja (Robinson y Vargo, 1997; Nelson y col., 2007). La hormona juvenil es otra de las moléculas que se ve alterada por la infección con *N. ceranae*, donde varios estudios sugieren que la alteración de la misma junto a la vitelogenina, explica la rápida maduración de las abejas y disminuyendo su esperanza de vida (Ares y col., 2012; Golsbrich y col., 2013). En cambio, *N. apis* no presenta dicha capacidad (Antúnez y col., 2009). Además *N. ceranae* es capaz de evitar que la célula hospedadora active su mecanismo de apoptosis como última herramienta defensiva, alargando la funcionalidad de la misma para aprovechar sus recursos (Higes y col. 2013; Kurze y col., 2015; Martín-Hernández y col., 2017).

En la nosemosis C las abejas más infectadas son las pecoreadoras, muchas de las cuales en el caso de *N. ceranae*, no regresan a la colmena (Higes y col., 2008c, 2009a; Krajl y Fuchs, 2010; Wolf y col., 2014; Jack y col., 2016) o si lo hacen tardan más en volver y con menor cantidad de alimento (Alaux y col., 2014; Naug y col., 2014). Esta enfermedad en las colonias se caracteriza por una fase asintomática muy prolongada previa a la muerte. En esta fase asintomática, se pueden detectar una serie de signos muy sutiles que pueden indicarnos que está afectada, como son: puesta de la reina en los meses invernales donde no suele haber cría, una mayor proporción de cría respecto a abejas obreras en los meses templados comparado con colonias no infectadas y sobre todo un descenso en la producción de miel en los dos años previos (Higes y col., 2008a).

El aumento de la cantidad de abejas jóvenes al inicio de la primavera diluye el porcentaje de parasitación de la enfermedad en la colonia. La mayoría de las abejas recién nacidas no están infectadas, por lo que se retrasa la posible infección de la reina. Esto tiene dos consecuencias: una aparente recuperación y un retraso en la muerte de la colonia (Higes y col., 2009a).

La infección por *N. ceranae* en las abejas pecoreadoras reduce el tiempo de vuelo, como consecuencia de ello se disminuye la capacidad de regreso a la colmena, de manera que la colonia va perdiendo abejas de manera progresiva (Wolf y col., 2014). Esta pérdida de abejas adultas obliga a las abejas obreras jóvenes a madurar precozmente para realizar las tareas de pecoreo. Esto conlleva una

reducción de la esperanza de vida de las abejas parasitadas (Higes y col., 2007; Paxton y col., 2007; Goblirsch y col., 2013; Lecocq y col., 2016), y una disminución del tiempo dedicado al cuidado de la cría principalmente, como a otras tareas de interior. Esto explica la aparición de otras enfermedades como la loque (loque americana: *Paenibacillus larvae*, loque europea: *Melissococcus plutonius*) o la ascosferosis (*Ascosphaera apis*) es común en colmenas en las que el proceso está muy avanzado (Hedtke y col., 2011).

Se ha demostrado que *N. ceranae* produce una infección más agresiva y con mayores porcentajes de mortalidad, que la enfermedad provocada por *N. apis* (Paxton y col., 2007) tanto a nivel de individuo (Higes y col., 2007a, 2013a; Aliferis y col., 2012; Dussaubat y col., 2012, 2013a; McDonnell y col., 2013; Aufauvre y col., 2014; Mayack y col., 2015; Eiri y col., 2015) como a nivel de colonia (Higes y col., 2008c; Botías y col., 2012b, 2013a; Dussaubat y col., 2013b; Goblirsch y col., 2013; Villa y col., 2013; Bekele y col., 2015; Wolf y col., 2014). Concretamente en España, se ha demostrado que el microsporidio *N. ceranae* tiene un papel fundamental en la muerte de las colonias (Martín-Hernández y col., 2007a; Higes y col., 2009a, 2010b; Botías y col., 2013a, b; Cepero y col., 2014). Sin embargo, no todos los estudios han encontrado evidencias de los efectos perjudiciales directos de este microsporidio en la muerte de colonias de abejas, incluso mencionan la existencia de abejas tolerantes a la infección por *Nosema* (Fries, 2010; Fernández y col., 2012; Stevanovic y col., 2011, 2013; Kurze y col., 2015, 2016b). La intervención de otros factores implicados como las diferencias genéticas existentes entre las abejas melíferas (Bourgeois y col., 2012; Fontbonne y col., 2013; Huang y col., 2014), las distintas prácticas apícolas (Malone y Gatehouse, 1998; Giersch y col., 2009; Van der Zee y col., 2010), las diferencias climáticas y ambientales (Martín-Hernández y col., 2007, 2009; Fenoy, 2009; Giersch y col., 2009; Tapasztó y col., 2009), o el empleo de metodologías muy distintas (Higes y col., 2013a), pueden explicar estos resultados aparentemente contradictorios.

## 5. DIAGNÓSTICO DE LA NOSEMOSIS

Debido a la falta de signos clínicos identificables, la OIE (Oficina Internacional de Epizootias, nueva Organización Mundial de Sanidad Animal, 2013) sugiere varios métodos. La metodología requerida para la detección de ambas especies es la misma. Se recogen abejas adultas, preferiblemente pecoreadoras (población que muestra mayor prevalencia de la infección), para evitar obtener falsos negativos si se analizan abejas de interior que probablemente estén menos parasitadas (OIE, 2013).

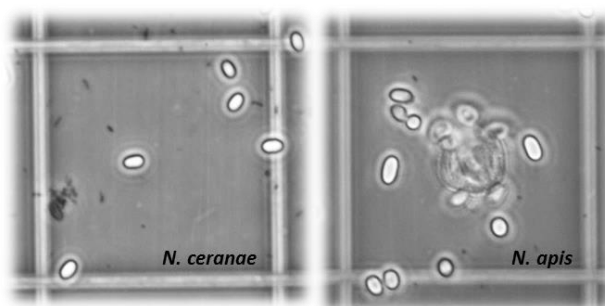
### 5.1 Examen macroscópico

El primero de ellos es realizar un examen macroscópico del ventrículo tras la disección de la abeja, examinando el aspecto y color del mismo. Las abejas infectadas presentan generalmente esta parte del tubo digestivo de color más claro o blanquecino, con un aspecto irregular y bajo tono muscular (Neira, 1994). Al contrario ocurre con un ventrículo sano cuyo color es más oscuro y es turgente. Estas características no son un signo patognomónico, ya que pueden deberse a otros procesos digestivos tales como la alimentación con jarabes que contengan levaduras (OIE, 2013).

## 5.2 Examen microscópico

Para la detección de la infección en una colonia mediante microscopía se recogen al menos 60 individuos, a fin de detectar el 5% de las abejas enfermas con un 95% de confianza (Fries, 1993). Se separan los abdómenes de las abejas que van a ser examinadas y se maceran en 2–3 ml de agua. Se colocan tres gotas de la suspensión en un porta bajo un cubre y se examinan a 400 aumentos en un microscopio de campo claro o de contraste de fases (Cantwell, 1970 citado por la OIE, 2013). En estas condiciones las esporas son refringentes, con un contorno definido y no se diferencia el contenido interno. Las esporas de *N. apis* son ovales y más grandes que las de *N. ceranae*, siendo estas últimas un poco más alargadas (ver apartado de etiología de la nosemosis). Requiere experiencia diferenciar ambas especies en infecciones mixtas, pero este método es válido para diferenciar *Nosema spp.* de otros microorganismos presentes en las abejas, como por ejemplo las levaduras (OIE, 2013).

**Figura 2.** Diferenciación en microscopía óptica del tamaño de las esporas de *N. ceranae* y *N. apis* sobre una cámara neubauer.



La visualización mejora con una tinción metacromática como *giemsa* que tiñe el contenido interno. Las esporas de *Nosema spp.* presentan una pared gruesa sin teñir y un interior azul sin rasgos distintivos. Esto se debe a que no llegan a teñirse los núcleos del interior de las esporas. Facilita la diferenciación de levaduras y sobre todo de los quistes de *Malpighamoeba mellificae*, los cuales tienen un tamaño similar pero son redondeados. Esta precaución es más importante en las infecciones con *N. apis*, ya que las infecciones por *M. mellificae* suelen cursar con heces líquidas de un color amarillo sulfuroso y un olor peculiar (OIE, 2013).

El examen cuantitativo se utiliza para determinar el grado de infección, a través del recuento de esporas en una cámara de recuento o hemocitómetro (Cantwell, 1970 citado por OIE, 2013). Este método ha sido seguido por muchos investigadores para establecer relaciones entre la cantidad de esporas y la gravedad de la enfermedad; sin embargo, no es viable para pronosticar la evolución de la enfermedad en condiciones de campo (Meana y col., 2010). Para ello otros estudios sugieren que es más correcto utilizar la proporción de abejas infectadas en la colonia para conocer el grado de infección, estableciendo el porcentaje de parasitación de las abejas de interior (Doull, 1965; Higes y col., 2008c; Botías y col., 2012a).

### 5.3 Técnicas de biología molecular

La identificación específica mediante microscopía óptica puede llevar a resultados negativos en casos de baja parasitación o si no se tiene experiencia para la diferenciación morfológica de estos microsporidios (Michalczyk y col., 2011). Por ello, se han desarrollado diferentes métodos de diagnóstico molecular para este fin, siendo el más empleado la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polimerase chain reaction*). La OIE (2008) recomienda el empleo de una técnica de PCR múltiple desarrollada por Martín-Hernández y colaboradores (2007), diseñada para amplificar la región SSU del gen 16S del ARN ribosomal (ARNr), que sirve para diferenciar ambas especies en una única reacción. Dicha técnica fue posteriormente mejorada por los mismos autores, con la incorporación de un control interno procedente de un gen mitocondrial (COI) de la abeja (Martín-Hernández y col., 2012) para verificar el estado de conservación del ADN en la muestra. Existen otras técnicas moleculares como la desarrollada por Fries y colaboradores (2013), en el mismo gen del ARNr, por medio de la cual se pueden identificar en una sola reacción los dos agentes patógenos y *Nosema bombi* (OIE, 2013). A su vez también se ha puesto a punto la identificación por PCR cuantitativa (Forsgren y col, 2010; Riviére y col., 2013; Huang y col., 2013). Esta PCR, además de tener mayor sensibilidad respecto a la PCR convencional, permite identificar la presencia o ausencia del microsporidio y cuantificar el grado de infección de la muestra.

Duquense, y colaboradores (2016) en un estudio documental sugieren que un 33% de los laboratorios nacionales de referencia de la Unión Europea utilizan para la identificación de *N. ceranae* y *N. apis*, la PCR descrita por Martín-Hernández y colaboradores (2007). Gisder y Genersch (2015) han desarrollado una técnica de RT-PCR-ELISA permite cuantificar el número de células infectadas.

Se han utilizado otras técnicas para la identificación y diferenciación de *N. apis* y *N. ceranae*. Aronstein y colaboradores (2013) pusieron a punto mediante la técnica ELISA, la identificación de *N. ceranae* a través del reconocimiento por anticuerpos. Este método abarata los costes que supone realizar una PCR. Este mismo propósito dio lugar a la caracterización de anticuerpos monoclonales (AcMc) frente a *N. ceranae* y *N. apis*, que posibilitan el desarrollo de una técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) rápida, específica y sensible que permita identificar ambas especies en muestras de colmenas (Fernández-Vadillo, 2014). También existe una técnica de amplificación isotérmica del ADN mediada por cebadores en bucle (*loop-mediated isothermal amplification*, LAMP) para diferenciar *N. apis* de *N. ceranae* (Ptaszynska y col., 2014). En esta técnica una secuencia de ADN diana se reconoce específicamente por dos o tres parejas de cebadores, de manera que su sensibilidad es mayor que en una PCR convencional.

## 6. CONTROL DE LA NOSEMOSIS

El control de la nosemosis está enfocado a la reducción del número de abejas enfermas en una colonia para así aumentar la producción y evitar la mortalidad de la misma. Esto se lleva a cabo mediante la prevención de la presencia de estos parásitos (profilaxis), la administración de tratamientos para curar la enfermedad (terapéutica) e impidiendo la transmisión a las colonias sanas

con alto riesgo de infección (metafilaxis). Un estado sanitario óptimo de las colonias de abejas es crucial para la prevención de la nosemosis, ya que a día de hoy la disponibilidad de tratamientos eficaces contra esta enfermedad es muy limitada.

### **6.1 Técnicas profilácticas**

La profilaxis es una técnica sanitaria que evita de manera preventiva, la aparición de enfermedades de riesgo en los animales y la contaminación de los medios materiales que se utilizan para su manejo.

Se ha descrito que las esporas de *N. apis* pueden eliminarse tras la fumigación de ácido acético al 60% en el material apícola o sometiénolo a una temperatura de al menos 60°C durante 15 minutos (Bailey, 1957 citado por OIE, 2013). La cera puede también esterilizarse manteniéndola a una temperatura de 49°C durante 24 horas (Cantwell y Shimanuki, 1970 citado por OIE, 2013). Sin embargo este método no parece útil frente a esporas de *N. ceranae*, ya que se ha observado que pueden soportar 60°C de temperatura (Fenoy y col., 2009) conservando su viabilidad. Se han descrito otros métodos como la irradiación con un haz de electrones de 10 kGy (kilogray), la radiación ultravioleta, la fumigación con ácido acético, la exposición a bajas temperaturas y la desecación que pueden reducir o inhibir la germinación de las esporas de *Nosema spp.* (Malone y col., 2001; Fenoy y col., 2009; Pernal y col., 2009,2010; Gisder y col., 2010; Zheng y col., 2014; Sánchez-Collado y col., 2014). En general, la adquisición y aplicación de esta metodología es aún muy complicada para los apicultores, por ello se limita a pruebas de laboratorio.

La aplicación de métodos de manejo en las colonias también puede ser una herramienta profiláctica útil, ya que la transmisión de esporas viables se da con cierta facilidad entre las abejas (Bailey, 1955; Paxton y col., 2007; Higes y col., 2008b, 2009; Malone y col., 2001; Smith, 2012). Por ello la limpieza de la colmena al terminar la invernada, el mantenimiento adecuado de los bebederos, la sustitución de cera de panal vieja, así como evitar la captura de enjambres de procedencia desconocida y realizar el cambio de reina anualmente (Botías y col., 2012b; Muñoz y col., 2014), favorecerá el control de la enfermedad. Es recomendable realizar exámenes periódicos para detectar la infección y mantener una adecuada alimentación que mantenga unos niveles adecuados de proteínas (polen) en la dieta de las abejas favoreciendo al equilibrio de su sistema inmunitario, ayudándolas a prevenir enfermedades (Basualdo y col., 2014; Antúnez y col., 2015). Toda esta información está al alcance del apicultor en guías de manejo y bioseguridad apícola, en la que se incluyen las buenas prácticas de higiene que constituyen una herramienta que contribuirá a reducir el impacto de la enfermedad y a minimizar el riesgo de transmisión. La plataforma tecnológica española de sanidad animal Vet+i (<http://www.vetmasi.es>) o la asociación británica de apicultores ([www.bbka.org.uk](http://www.bbka.org.uk)) han desarrollado este tipo de guías.

### **6.2 Técnicas metafilácticas y terapéuticas de base química (origen natural y sintético).**

La metafilaxia consiste en el tratamiento de un grupo de animales del que se sospecha que pueden sufrir una enfermedad al haber aparecido un porcentaje de individuos en la explotación enfermos o infectados. Es una técnica especialmente utilizada en situaciones de alto riesgo en las que se administra un medicamento (al mismo tiempo que cuando se aplica el tratamiento a animales clínicamente enfermos) a un grupo de animales clínicamente sanos, que están en contacto con los

animales enfermos para prevenirlos de desarrollar signos clínicos y para prevenir la propagación de la enfermedad (Agencia Europea de Medicamentos, EMA/CVMP/414812/2011-Rev.1, citado por [www.aemps.gob.es](http://www.aemps.gob.es), 2015). De esta forma a un grupo de colonias de abejas, se les administra un tratamiento que ayude a prevenir y controlar el agente infeccioso. Por otra parte la terapéutica consiste en la administración de tratamientos para curar la enfermedad a individuos ya enfermos.

La **fumagilina** fue el producto activo más utilizado para el control de las nosemosis, suministrado en una mezcla de azúcar y agua (Katznelson y Jamieson, 1952; Cantwell y Shimanuki, 1970 citado por OIE, 2013a; Fries, 1997 citado por Garrido-Bailón, 2012; Nozal y col., 2008; Higes y col., 2010, 2011). Este antibiótico se extrae a partir del hongo *Aspergillus fumigatus* (Bailey, 1955; Webster, 1994; Didier, 1997) y es utilizado en el tratamiento de la microsporidiosis en humanos causada por *Enterocytozoon bieneusi* (Molina y col., 2002). Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que inhibe la multiplicación del parásito de la malaria (especies del género *Plasmodium spp.*, Chen y col., 2009) mediante la inhibición de la enzima 2-metionina aminopeptidasa (MetAp2) de este parásito, proteína citosólica de reparación celular, homóloga a la del ser humano la cual es promotora de la angiogénesis (generación de vasos sanguíneos). Por ello en humanos también se ha analizado su eficacia en la inhibición del crecimiento de tumores (Ingber, 1990).

La ausencia de un límite medio de residuos (LMR) establecido en miel junto con la falta de estudios de toxicidad crónica en abejas y humanos, llevó a su prohibición en Europa en 2008 por la Agencia Europea del medicamento, impidiendo su uso en abejas melíferas. Este producto ha sido y es una de las pocas moléculas activas frente a los microsporidios (Geoffrey y col., 2008; Gisder y Genersch, 2015), actuando solamente sobre la forma vegetativa de *Nosema spp.*, en el interior de las células del epitelio ventricular (McCowen, 1951; Bailey, 1953). La fumagilina puede llegar a alcanzar un 100% de eficacia, siempre que sea aplicada en una posología adecuada (Higes y col., 2008c, 2009a, 2011). Es importante destacar la alta inestabilidad de esta molécula frente a la radiación y la temperatura (Nozal y col., 2008), que acaba por degradarse a lo largo del tratamiento, lo que hace que en ocasiones se haya puesto en duda su eficacia (Huang y col., 2013; Giacobino y col., 2016). De hecho Huang y colaboradores (2013) sugirieron que la exposición continua de colonias de abejas a concentraciones inferiores a las del tratamiento recomendado, proveniente de los residuos almacenados después del tratamiento con fumagilina, ayudan al cabo de varios meses a una proliferación más activa del microsporidio en comparación a colonias que no fueron tratadas. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que el tratamiento con fumagilina ayuda a mantener la producción de miel, mientras que colmenas infectadas y no tratadas su producción disminuye (Botías y col., 2013b).

Como se ha mencionado anteriormente, aparte de la fumagilina, no hay ningún medicamento veterinario disponible en el mercado para su aplicación como tratamiento frente a la nosemosis. Por ello en los últimos años los estudios están enfocados a la búsqueda de nuevos compuestos preferentemente de origen vegetal, con carácter antimicrobiano y antifúngico que puedan usarse en ganadería ecológica.



A continuación se describen otras sustancias (además de la fumagilina comentada anteriormente) en las que se ha comprobado que tienen cierta eficacia frente a *Nosema*, o frente a microsporidios que afectan a otras ganaderías.

El **ácido oxálico** es un ácido carboxílico ( $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ) orgánico descubierto por Wilhelm (1776), procedente de las plantas. Se encuentra de forma natural en la miel en concentraciones variables dependiendo del origen vegetal de la misma, ya que es un compuesto muy común en plantas del género *Oxalis spp.* y *Rumex spp.* (Barbero y col., 1997). Esta molécula ha demostrado tener una alta eficacia contra *Varroa destructor*, observándose eficacias superiores al 90% en condiciones donde las colonias permanecen sin cría (Nanetti y Stradi, 1997, Higes y col., 1998), y un 82,8% cuando hay cría (Arculeo, 2000). Algunos estudios sugieren que a altas dosis provoca una cierta toxicidad en las abejas (Martín-Hernández y col., 2007) y análisis inmuno-histoquímicos han revelado la aparición de necrosis en células del ventrículo de abejas alimentadas con ácido oxálico (Gregorc y Smodiš-Škerl, 2007), incluso se ha observado una disminución de la longevidad de las abejas (Schneider y col., 2012). En lo referente a *N. ceranae*, Nanetti y colaboradores (2015) administraron a abejas infectadas experimentalmente con esporas de *N. ceranae*, un jarabe que contenía ácido oxálico. Mientras se observó un aumento exponencial del porcentaje de parasitación de las abejas que no fueron tratadas con ácido oxálico. Por el contrario, las que sí fueron tratadas con ácido oxálico el número de esporas también aumentó, pero de forma más gradual. En un ensayo paralelo realizado en campo, dispensaron el mismo jarabe por goteo en la colmena, de esta forma las abejas ingieren el jarabe con ácido oxálico al limpiarse. El seguimiento de la carga parasitaria durante los meses de otoño e invierno, mostró que colmenas tratadas con ácido oxálico ven también disminuida su carga parasitaria en *N. ceranae* después del tratamiento.

Otro compuesto de origen vegetal es el **resveratrol**. Es una fitoalexina producida de manera natural en las plantas como respuesta a infecciones, daños, radiación ultravioleta, frío, calor, estrés abiótico, etc. Varios estudios en salud humana lo proponen como principio activo para el tratamiento de algunas patologías (Jung y col., 2005; Leiro y col., 2010). Es un componente presente en la dieta alimentaria del ser humano y gracias a su nula toxicidad forma parte de muchos alimentos a concentraciones muy variables (Fernández-Mar y col., 2011), además de usarse como suplemento alimentario. El resveratrol ha sido utilizado con éxito frente a otros microsporidios que afectan a humanos y mamíferos (Leiro y col., 2004; Jung y col., 2005; Didier y col., 2006). Hay estudios que muestran cierta capacidad de inhibición en el desarrollo de *N. ceranae* (Maistrello y col., 2008), sin embargo trabajos posteriores no mostraron los mismos resultados de eficacia (Costa y col., 2010). Porrini y colaboradores (2011) demostraron en pruebas realizadas en laboratorio, que el resveratrol adicionado a alimentos era capaz de aumentar la longevidad de las abejas y resultaba eficaz en la inhibición del desarrollo de *N. ceranae* en abejas infectadas. Ensayos previos realizados en el CIAPA mostraron que el resveratrol resultaba eficaz disminuyendo la carga parasitaria de *N. ceranae* en las colonias de abejas tratadas (resultados del proyecto RTA-2009-000105-C02-01) respecto a las testigo.

Otro grupo de sustancias susceptibles de utilizarse para el control de la nosemosis son los componentes mayoritarios que forman parte de los **aceites esenciales**. Entre ellos se encuentra el **timol**. Es un compuesto fenólico, de olor característico que está presente en la naturaleza como constituyente de muchos aceites esenciales como el de tomillo y de orégano. Tiene propiedades bactericidas, plaguicidas y fungicidas. Es ampliamente conocido en apicultura debido a sus efectos acaricidas frente a *V. destructor* (Chiesa, 1991). Maistrello y colaboradores (2008) vieron disminuida la



carga parasitaria en abejas infectadas con *N. ceranae* y alimentadas con timol respecto a los testigos. Los mismos resultados fueron obtenidos en un ensayo similar años después por Costa y colaboradores (2010). Porrini y colaboradores (2011) observaron una disminución los recuentos de esporas en abejas infectadas con *N. ceranae* a las que se les administró jarabes complementados con extractos de plantas y aceites esenciales de *Artemisia absinthium*, *Allium sativum*, *Laurus nobilis*, and *Ilex paraguariensis*, obteniendo resultados significativos con *L. nobilis* donde uno de los componentes mayoritarios es el timol. Damiani y colaboradores (2014), observaron del mismo modo resultados similares frente a *N. ceranae* en la aplicación de extractos de *L. nobilis*.

Existen varios **complementos alimenticios** comerciales recomendados para el control de la nosemosis, que están compuestos de diferentes extractos vegetales, vitaminas, minerales, y ácidos esenciales como el ApiHerb® (Luna-Olivares y col., 2016; Michalczyk y col., 2016; Bessi y Nanetti, 2005; Nanetti y col., 2014), el Hive alive®, el VitaFeed Gold® (Botías y col., 2013b; Shumkova y Zheliazkova, 2013), el Nosestad® (Botías y col., 2013b) y el Nonosz® (Matray Eniko y col., 2011). Estos productos son utilizados por los apicultores ya que en sus prospectos indican tener cierta eficacia para controlar la nosemosis, aunque se ha descrito que estos complementos no curan la enfermedad, pero ayudan a reducir en mayor o menor medida el número de esporas (Gajger y col., 2009, 2013). Por otro lado el Nozevit® se trata de un producto a base de un preparado natural de polifenoles vegetales extraído principalmente del árbol *Nothofagus bark* (Orden *Fagales*) que ha mostrado tener cierta eficacia disminuyendo la carga parasitaria de *N. ceranae* (Gajger y col., 2009; Higes y col., 2014). El Provigoro® es un desinfectante natural compuesto de ácidos orgánicos, 100% natural que ayudó a disminuir la carga parasitaria en colonias parasitadas con *N. ceranae* (Tsagkarakis y col., 2015). Por último productos compuestos de ácido húmico y fúlvico, componente activo del producto comercial Inmuno-bee® y Fulvo-bee® respectivamente se comercializan como productos que previenen la infección por este microsporidio (Alpha-Vet Animal Health Ltd, <http://www.alphafeed.eu>).

El **toltrazuril** es otro compuesto de síntesis química utilizado frente a la nosemosis en trabajos experimentales. Es un medicamento veterinario con propiedades coccidiostáticas que actúa inhibiendo el transporte de electrones en la fosforilación oxidativa del agente patógeno. Es un producto utilizado habitualmente para la prevención de la coccidiosis en conejos, pollos, vacas, ovejas, etc. Varios estudios lo han probado contra microsporidios como *Encephalitozoon cuniculi* en ensayos *in vitro* (Franssen y col., 1995) y *Glugea anomala* (Schmahl, 1990; Costa y col., 2000) con resultados de eficacia muy variables. Rodríguez y colaboradores (2009) realizaron un estudio comparativo de esta molécula y la fumagilina en colmenas infectadas con *N. ceranae*, mostrando que el toltrazuril actuaba con una eficacia muy similar a la fumagilina.

### **6.3 Técnicas metafilácticas y terapéuticas de base molecular: tratamiento con ARN doble cadena (dsRNA)**

El ARN de doble cadena (dsRNA) es el precursor del ARN de interferencia (ARNi o iRNA). Se tratan de moléculas generadas por la célula que forman parte del mecanismo de regulación de la actividad génica en el desarrollo celular de plantas y animales. En 1980, el Dr. Richard A. Jorgensen, genético molecular, y sus colaboradores observaron cómo se podía dar diferentes coloraciones a los pétalos de petunias a través de la co-supresión de los genes de pigmentos de estas flores. Este mecanismo post-transcripcional de silenciamiento génico ha emergido como una potente y específica estrategia de control genético.

El silenciamiento génico es un mecanismo ampliamente utilizado por la célula viva para modificar los niveles de proteínas propias o para bloquear la síntesis de proteínas ordenadas por virus u otros agentes patógenos. Es un mecanismo conservado en la mayoría de los filos en los que se ha estudiado, incluyendo plantas, invertebrados y mamíferos (Hammond y col., 2001). La activación de este mecanismo es provocado por la presencia de ARN de doble cadena (*double-stranded RNA*, *dsRNA*), una inusual estructuración del ARN (normalmente de simple cadena) generada por dos cadenas simples del ARN que complementan generando el *dsRNA*, o por la presencia de virus cuyo material genético adopta en algunos casos esta estructura (por ejemplo, replicación vírica). Estas moléculas de ARN doble son reconocidas como extrañas y cortadas en trozos más pequeños (*small interference RNA*, *siRNA*) por la proteína *Dicer* (proteína específica de regulación génica, acompañadas de otras como *Risc* y *Ago*), de manera que quedan inservibles como plantilla para la síntesis nueva de proteínas, silenciando la actividad específica de ese gen.

Este mecanismo se ha aprovechado para tratar de evaluar la alteración de la expresión génica y función proteica en abejas y otros organismos (Brutscher y col., 2015). Además se considera un mecanismo de defensa natural frente a infecciones víricas en plantas y animales, ya que los virus, en su fase de desarrollo replicativo, pasan por una etapa obligada de ARN de doble cadena (*dsRNA*), molécula que activa automáticamente el mecanismo de silenciamiento. Algunos trabajos mencionan la capacidad que tiene el dsRNA en producir un cambio global en muchos otros genes que no son específicos de la secuencia que portan (Jarosch y col., 2012; Nunes y col., 2013). Esto sugiere que el dsRNA no solo sirve como sustrato para el bloqueo de genes a través de la formación del iRNA, sino que tiene gran influencia en diversas rutas de regulación génica.

Esta nueva herramienta se está desarrollando para proteger a las abejas de infecciones de virus como *Israeli acute paralysis virus* (IAPV), *Deformed wings virus* (DWV), y *Chinese sacbrood virus* (CSBV), que en condiciones de laboratorio ha mostrado una inhibición de la proliferación (Maori y col., 2009; Liu y col., 2010; Desai y col., 2012; Chen y col., 2014; Grozinger y col., 2015).

El ARN de interferencia (RNAi) también se ha usado de manera efectiva en el control de *V. destructor* en la colonia (Garbian y col., 2012). Además estudios más recientes confirman la aparición de dsRNA viral (concretamente DWV) en análisis transcripcionales de *V. destructor*, lo que sugiere la utilización de este mecanismo para el control del ácaro (Campbell y col., 2015).

Respecto a *N. ceranae*, el equipo de Huang y colaboradores (2016) mediante ultra-secuenciación analizaron los microRNAs (miRNA) expresados por abejas infectadas con el

microsporidio, sugiriendo que hay una expresión diferencial de estos miRNAs en respuesta a la infección. Paldi y colaboradores (2010) silenciaron un transportador de ADP/ATP del parásito que se tradujo en una disminución de la carga parasitaria. Estos estudios sugieren que este mecanismo de silenciamiento puede ser inducido por el propio patógeno o por el hospedador, ya que encontraron un dominio *Dicer* en el genoma de *N. ceranae*. Otros trabajos utilizan como diana, genes de la propia abeja que son esenciales para el desarrollo del patógeno, de manera que su silenciamiento es capaz de disminuir eficazmente la proliferación del mismo sin repercutir a la propia célula hospedadora (Li y col., 2016). Por todo ello este innovador mecanismo abre puertas al diseño de tratamientos de control de patógenos más específico, basados en innovadoras técnicas moleculares.



# CAPÍTULO I





## CAPÍTULO I

### Estudio de medidas profilácticas. Evaluación esporicida de diferentes sustancias contra esporas de *N. ceranae*.

Una parte del ciclo biológico de *N. ceranae* tiene lugar fuera del hospedador. Durante este periodo el microsporidio debe sobrevivir bajo condiciones poco propicias hasta que encuentran un nuevo hospedador susceptible. Por ello, las esporas de segunda generación (o esporas medioambientales) de estos microorganismos poseen una gruesa pared quitinosa que les proporcionan una gran capacidad de resistencia a condiciones ambientales adversas tales como: altas temperaturas, desecación, humedad, exposición a radiaciones ionizantes mientras se encuentran en el exterior de la abeja.

Debido a esta capacidad de resistencia dentro de las estrategias de control es imprescindible incluir, medidas de profilaxis que permitan la desinfección del material apícola, reduciendo así la exposición en las abejas sanas.

El objetivo de este trabajo fue la evaluación de sustancias potencialmente útiles para la limpieza y desinfección del material apícola. Para ello hubo además que desarrollar una metodología específica que nos permitiese determinar la capacidad de desinfección de las sustancias evaluadas.



**MATERIAL Y MÉTODOS****1. SELECCIÓN DE SUSTANCIAS**

En su mayor parte la selección de productos se hizo en base a sustancias de uso comercial con acción desinfectante como hipoclorito de sodio (lejía), amoníaco, etanol, povidona iodada (Betadine®), Mycoplasma OFF™ (32,5 % 1-propanol, 18 % etanol, 0,1 % glutaraldehído, 0,05 % Mynox®), Biocidal ZF™ (a base de amonio cuaternario) e Inouko® (tabla 1).

El resto de productos utilizados se eligieron por su potencial actividad frente a estos microsporidios al ser biocidas de aplicación en agricultura o apicultura, aplicados para el control de plagas. Entre estos se encuentran los glucosinolatos (ver capítulo II. A) y los ácidos orgánicos acético y oxálico (tabla 1).

**Tabla 1.** Sustancias utilizadas para los ensayos de acción esporicida.

| <b>Denominación</b>                               | <b>Grupos</b>   | <b>Suministrador</b> | <b>Acción</b> | <b>Concentración</b>        | <b>Composición química</b>  |
|---|-----------------|----------------------|---------------|-----------------------------|---|
| Lejía   | <b>Le y LeD</b> | JEN® Química S.L.    | C             | 0,8 (Le)* y 0,008 (LeD) g/l | Hipoclorito de sodio (NaClO), 40 g/l cloro activo                                 |
| Amoníaco  | <b>AMO</b>      | Quicesa cleaning     | C             | 1,65%*                      | Amoníaco (NH <sub>3</sub> ) 3,33 % (diluido al 50%)                               |
| Alcohol 96°                                       | <b>ALC</b>      | KERN PHARMA          | C             | Uso directo *               | Etanol (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH) 99,9 %                                  |
| Povidona iodada                                   | <b>BET</b>      | Betadine®            | C             | 1%                          | Povidona iodada 10 g/l  |
| Mycoplasma OFF™                                   | <b>MYC</b>      | Minerva Biolabs      | C             | Uso directo *               | 32,5 % 1-propanol, 18 % etanol, 0,1 % glutaraldehído, 0,05 % Mynox®               |
| Biocidal ZF™                                      | <b>ZF</b>       | Wak-Chemie GMBH      | C             | Uso directo *               | Componentes amonio cuaternario  |
| Inouko  | <b>IK</b>       | CEVA                 | C             | 1 % *                       | Peróxido de hidrógeno al 25%, ácido peracético 5%                                 |
| Ácido acético                                     | <b>ACE</b>      | Panreac              | C             | 99%                         | Ácido etanoico (ácido acético, C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ) 99% |
| Ácido oxálico                                     | <b>AO</b>       | CEVA, Ecoxal®        | C             | 6,6 g/l **                  | Ácido etanodioico (ácido oxálico, C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )  |
| Harinas de <i>Brassica nigra</i> (Glucosinolatos) | <b>SIN</b>      | CREA                 | E             | 40 g/l ***                  | Isotiocianatos (extracto vegetal, composición variable)                           |

\*Concentraciones seleccionadas según la recomendación del fabricante. \*\* Concentración recomendada para el tratamiento contra *V. destructor*. \*\*\* 1 gramo de harina / 25 ml de agua destilada. Todas las diluciones se realizaron con agua destilada. C: acción por contacto. E: acción por evaporación.



## 2. EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN DESINFECTANTE

### 2.1. Obtención de esporas de *N. ceranae*

Las esporas se obtuvieron de abejas adultas procedentes de colonias experimentales de *Apis mellifera iberiensis* que estaban localizadas en el Centro de investigación Apícola y Agroambiental de Marchamalo (CIAPA) y naturalmente infectadas con *N. ceranae*. Las abejas se maceraron en agua destilada (esterilizada) usando un homogeneizador automático (Stomacher 80-Microbiomaster) durante 120 segundos a baja velocidad dentro de una bolsa de plástico estéril con filtro (BA6040 strainer bags<sup>®</sup>). El macerado se pasó a un tubo de 15 ml y se centrifugó durante 10 minutos a 1811 *g*. Tras eliminar el sobrenadante se añadió un mililitro de agua destilada al sedimento donde se encontraban la mayor parte de las esporas que se purificaron en un gradiente isotónico de Percoll<sup>®</sup> al 95% (Higes y col., 2008b). Mediante PCR se confirmó que las esporas purificadas eran *N. ceranae* (Martín-Hernández y col., 2007). Una vez purificadas las esporas se conservaron a temperatura ambiente y en oscuridad.

### 2.2. Protocolo para la evaluación de productos de desinfección

Dada la ausencia de técnicas descritas para evaluar el efecto de las sustancias sobre la viabilidad de los microsporidios se diseñó una metodología basada en la Farmacopea Europea y las normas UNE (UNE-EN 14347:2005, UNE-EN 1040:2006, UNE-EN 1275:2007, UNE-EN 1650:2008, UNE-EN 1276:2010/AC: 2010) descritas todas ellas para la evaluación de la actividad desinfectante de diferentes sustancias frente a los agentes esporulados.

Con el fin de evaluar la acción esporicida en una superficie estándar se utilizaron cuadrados de acero inoxidable de 5 cm<sup>2</sup> perfectamente lavados y esterilizados que se contaminaron con 0,1 ml de una solución de 100.000 esporas de *N. ceranae*. El inóculo se extendió usando un asa de digralsky en un área de 3 cm<sup>2</sup> y se dejó secar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

#### 2.2.a) *Sustancias de acción por contacto*

Los productos evaluados se detallan en la tabla 1. Cada uno de ellos se distribuyó hasta cubrir la superficie contaminada, incluyendo además un grupo que se cubrió con agua estéril que sirvió como testigo negativo. Todos los productos se mantuvieron durante 5 y 15 minutos. Transcurrido este tiempo las superficies se lavaron añadiendo 10 ml de agua destilada con una pipeta Pasteur que se introdujeron en un tubo de 15 ml para recuperar el máximo número de esporas. La solución se centrifugó 10 minutos a 1181 *g* y el sedimento se reconstituyó en un mililitro de agua estéril. Se realizaron 2 réplicas para cada producto.

#### 2.2.b) *Sustancias de acción por evaporación*

En este caso se evaluó la actividad de la harina de *Brassica nigra* (glucosinolatos, ver más información en capítulo II. A). Se diseñó una metodología específica que permitiese la exposición de las esporas a los gases. Para ello las placas de acero inoxidable contaminadas con esporas de *N. ceranae* se introdujeron en un desecador de 12 litros de volumen (SIMAX). La harina de *B. nigra* (1

gramo) se había colocado previamente en el fondo del desecador en un vaso de precipitados (50 ml) junto a un imán agitador y se le añadió agua a una proporción 1:25 para que comenzase la reacción y liberación de los gases, ya que los glucosinolatos en presencia de agua liberan los tiocianatos que son las moléculas activas (ver capítulo II.A). El desecador se cerró inmediatamente sellando con vaselina para garantizar la hermeticidad. Todo este sistema se colocó sobre una placa agitadora magnética (figura 3). Las placas se mantuvieron expuestas a los gases generados durante 3, 6 y 24 horas y se realizaron 3 réplicas para cada periodo de tiempo. Se dispuso por triplicado un testigo de viabilidad (placas contaminadas) en las mismas condiciones pero sin la exposición a los gases. Transcurrido el tiempo de exposición se recuperaron las esporas con la misma metodología empleada en el apartado anterior para las sustancias por contacto.

**Figura 3.** Detalle del sistema desarrollado para la evaluación de las sustancias por evaporación.



\*Desecador con placas de acero inoxidable contaminadas con esporas de *N. ceranae* para su exposición por evaporación a los isotiocianatos, tiocianatos y nitrilos (gases) liberados al contactar las harinas con el agua. Se mantuvo en continua agitación para asegurar la liberación total de los gases. Inmediatamente después de añadir el agua se introdujo en el desecador y se cerró herméticamente.

### 2.3. Citometría de flujo

La viabilidad de las esporas expuestas a los productos fue medida mediante la técnica de citometría de flujo (servicio prestado por la Universidad de Alcalá). Esta técnica permite cuantificar esporas vivas y muertas. Las esporas recuperadas (1 ml) de cada producto, tiempo de exposición y replicado se dividió en dos alícuotas de 500  $\mu$ l que se analizaron de forma independiente. A cada muestra se le añadieron 5  $\mu$ l de yoduro de propidio (IP; 1 mg/ml P4864, Sigma-Aldrich®) y se analizaron en un citómetro FACS Calibur (Becton-Dickinson; Argon laser 488nm). Se utilizó una suspensión de esporas autoclavadas para establecer la población de esporas muertas (testigo positivo de mortalidad). Los testigos de viabilidad (esporas vivas) estaban formados por esporas expuestas a agua destilada (en el caso del análisis por contacto) y a atmósfera ambiente (luego recuperadas en agua, en el caso del análisis por evaporación).

Los parámetros de tamaño y complejidad de las esporas de *N. ceranae* se establecieron en base a estudios previos (Sánchez-Collado y col., 2014). Se determinaron un total de 10.000 eventos (esporas) en cada 500 µl de suspensión, asumiendo que las esporas que emitían fluorescencia estaban muertas (IP positivas) y las que no emitían fluorescencia (IP negativas) estaban vivas, de manera que se obtuvo el valor del porcentaje de esporas muertas para cada producto analizado y tiempo de exposición. Por cada muestra biológica se obtuvieron un total de 4 medidas en el caso de las sustancias por contacto (2 replicados por 2 alícuotas de 500 µl) y 6 en el caso de las sustancias por evaporación (3 replicados por 2 alícuotas de 500 µl).

### 3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para establecer si existían diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones de esporas vivas y muertas en cada grupo experimental se analizaron los resultados obtenidos mediante un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA). Posteriormente se realizaron los análisis *post hoc* correspondientes, para la comparación de todos los grupos entre sí (productos evaluados, tiempo de exposición y concentraciones), respecto a los testigos negativo (tratado con agua) y positivo (autoclavadas). Para la evaluación de la eficacia de las sustancias por evaporación se utilizó un análisis no paramétrico de *Kruskal-Wallis* para confirmar si existían diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de muerte de esporas entre los diferentes grupos. Posteriormente se compararon los grupos entre sí, mediante el test no paramétrico de *Mann-Whitney*. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ . Todos los análisis se procesaron mediante el paquete estadístico SPSS versión 21.0.

## RESULTADOS

La metodología desarrollada permitió evaluar la eficacia desinfectante de las diferentes sustancias analizadas independientemente de si actúan por contacto o por evaporación.

### 1. SUSTANCIAS DE ACCIÓN POR CONTACTO

Durante el desarrollo de la técnica se observó que ciertas sustancias ensayadas como la lejía, el amoníaco, el etanol, el ácido acético y la povidona iodada mostraron una capacidad desincrustante facilitando la recogida de las esporas de la superficie de acero inoxidable.

El análisis por citometría de flujo permitió la diferenciación entre las poblaciones de esporas viables y esporas muertas en función de la fluorescencia emitida por la tinción de yoduro de propidio (IP). De manera que el porcentaje de mortalidad obtenido para cada sustancia y tiempo de exposición se muestra en la figura 4 y las representaciones obtenidas por el citómetro en las figuras 5 y 6.

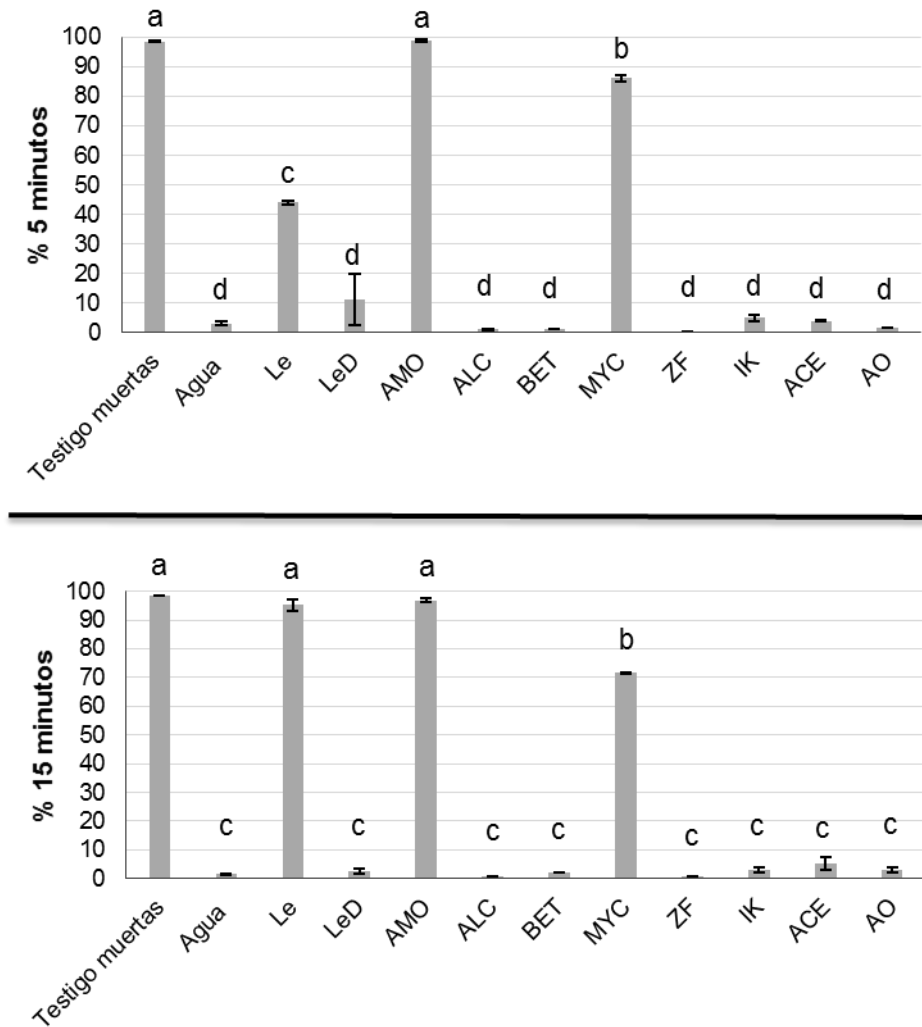
Entre las sustancias evaluadas, el amoníaco, la lejía, y el Mycoplasma OFF™ produjeron una mortalidad significativamente mayor a la del testigo negativo (agua), indicando su capacidad esporicida (ANOVA;  $F = 1628,082$ ,  $p < 0,000$ ). De hecho fueron los productos de uso común como el amoníaco y la lejía (a la concentración de 0,8 g/l) los que mostraron la mayor eficacia provocando la muerte de esporas (96,98% y 95,26% respectivamente), no observándose diferencias estadísticamente significativas en la mortalidad frente a las esporas autoclavadas (98,57%,  $p > 0,05$ ). En el caso del Mycoplasma OFF™ se observó una disminución de la mortalidad a los 15 minutos (87,14% en 5 min, 71,65% en 15 min;  $p < 0,05$ ) aunque paralelamente se observó un aumento de la cantidad de restos celulares (figura 6). Lo que puede indicar una gran destrucción de las esporas que ya no pueden detectarse en el citómetro.

El tiempo de exposición de algunos productos como la lejía (0,8 g/l) demostró ser un factor importante de forma que el porcentaje de mortalidad de esporas fue mayor a los 15 minutos ( $p < 0,05$ ). Igualmente la concentración de esta sustancia tuvo una gran influencia en la eficacia, y la mayor mortalidad se observó a las concentraciones más elevadas (0,8 g/l) con un 95,26 % de mortalidad frente a la más diluida (0,008 g/l;  $p < 0,05$ ) que fue del 2,63 %.

Por el contrario otras sustancias como el ácido acético, el ácido oxálico, el alcohol 96°, el Betadine®, el Biocidal ZF™ y el Inouko® no produjeron una mortalidad significativamente mayor que el testigo negativo ( $p > 0,05$ ) siendo en todos los casos inferior al 10% de mortalidad. En el caso del ácido acético sin embargo se detectó un aumento de los restos celulares observado principalmente a los 5 minutos (figura 6). A los 15 minutos los restos celulares disminuyeron detectándose también una disminución en la población de esporas detectadas.

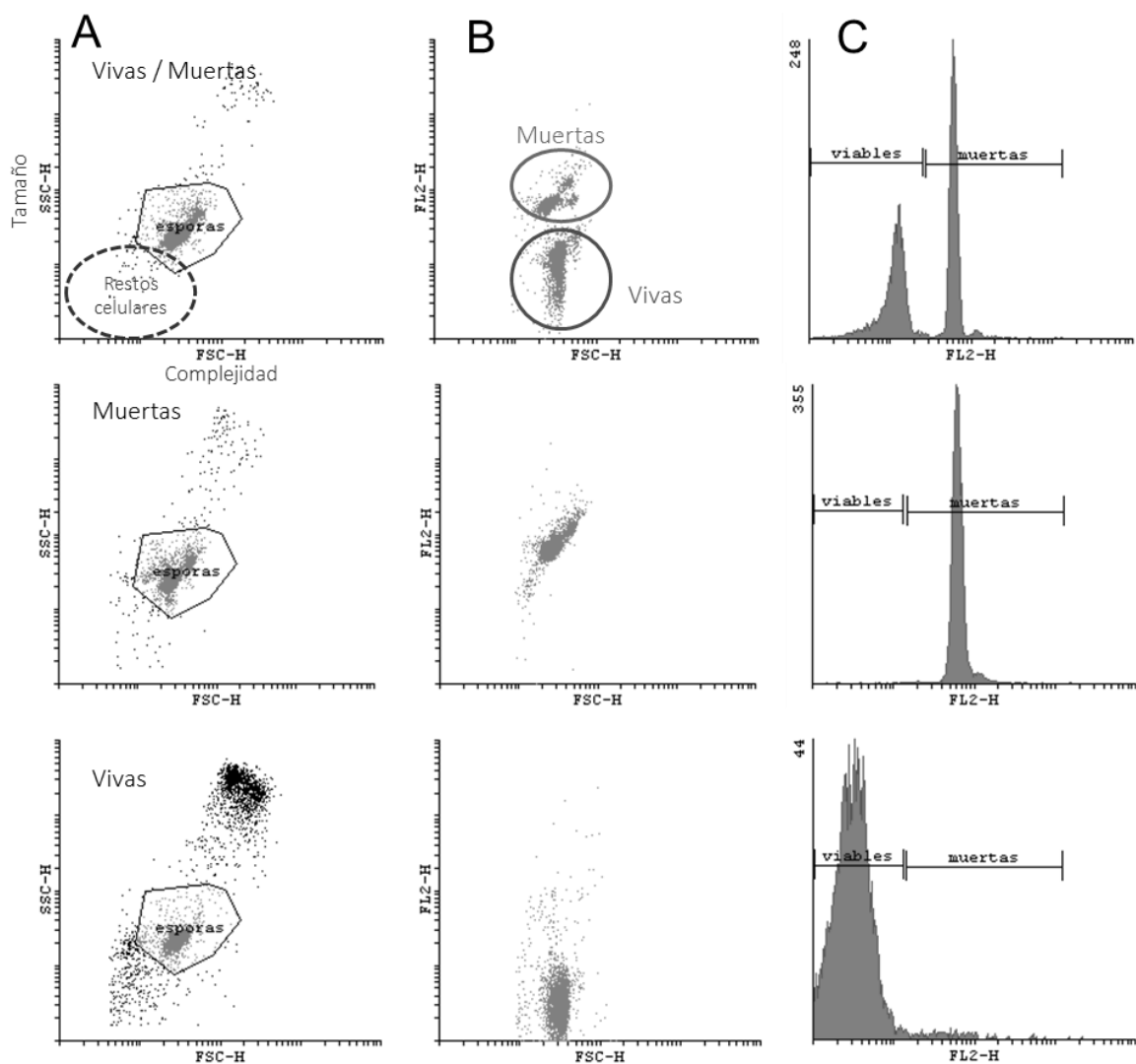
Los diagramas de citometría del resto de sustancias se encuentran disponibles en el anexo I.

**Figura 4.** Valores medios del porcentaje de mortalidad (%) de cada grupo.



\*Las barras hacen referencia a la desviación estándar. Las letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Le (lejía), LeD (lejía 1/100), AMO (amoniaco), ALC (alcohol 96°), BET (povidona iodada), MYC (Mycoplasma OFF), ZF (Biocidal ZF), IK (Inouko), ACE (ácido acético), AO (ácido oxálico).

**Figura 5.** Representación de los histogramas obtenidos del análisis de citometría.



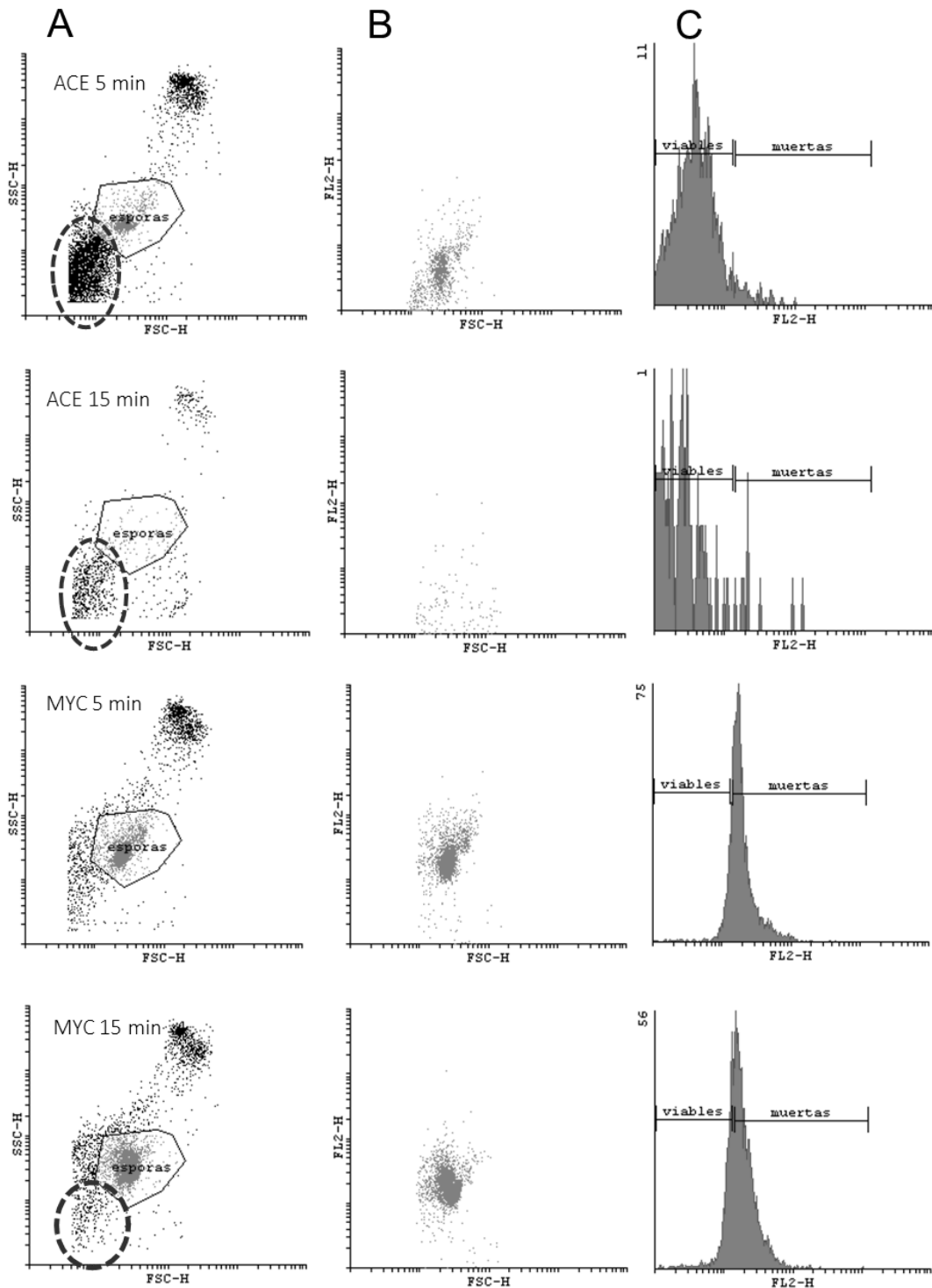
\*Las características o parámetros de cada evento (esporas) están basados en la dispersión de la luz y de las propiedades de fluorescencia.

A, La dispersión frontal (FSC; *forward scatter*, determina el tamaño) y la dispersión lateral (SSC; *side scatter*, la complejidad) recogidos por los detectores de luz se conforman en escala logarítmica, identificando la población de esporas. Los polígonos representan la subpoblación de esporas, que se estableció de acuerdo a estudios preliminares.

B, es la dispersión frontal de luz (FL2-H) detectada a 585/45 nm, que sirve para detectar la fluorescencia del PI (ioduro de propidio) bajo una emisión azul láser de argón a 480 nm.

C, son los histogramas de las esporas representando la ausencia o presencia de fluorescencia de PI; en la ordenada se representa el recuento del número de esporas (eventos), mientras que en abscisas se indican la intensidad de la fluorescencia, todo ello en escala logarítmica. Vivas / muertas representa con círculos las diferentes subpoblaciones que se encuentran en las gráficas.

**Figura 6.** Representación restos celulares.



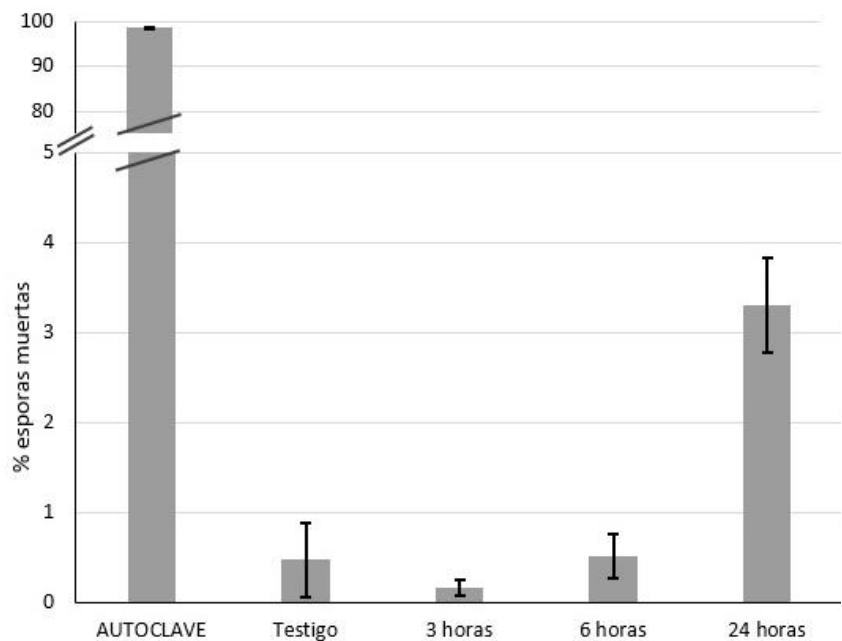
ACE representa el efecto del ácido acético sobre las esporas observadas en el análisis de citometría de flujo. Se puede observar la gran cantidad de restos celulares (circulo azul discontinuo) principalmente a los 5 minutos y la reducción del número de eventos detectados (esporas) transcurridos los 15 minutos. MYC representación del aumento de los restos celulares generados a los 15 min por Mycoplasma OFF<sup>TM</sup>.



2. SUSTANCIAS DE ACCIÓN POR EVAPORACIÓN

La mortalidad de esporas observada por la exposición a las harinas de *B. nigra* (figura 7) durante 24 horas fue muy baja y mostraron una mortalidad del 3% significativamente más alta que el testigo no expuesto a los gases (Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ , U Mann-Whitney  $p < 0,001$ ; figura 7).

**Figura 7.** Porcentaje de mortalidad de las esporas analizadas por evaporación a las harinas de *B. nigra* durante 3, 6 y 24 horas.





## DISCUSIÓN

En este trabajo se presenta por primera vez la evaluación de diferentes sustancias para determinar su eficacia esporicida, incluyendo sustancias de uso común, productos comerciales y otras sustancias que potencialmente pudieran tener un efecto sobre la viabilidad de las esporas. De hecho la mayor eficacia esporicida se observó en sustancias de uso común como son el amoníaco y la lejía (ambos usados la concentración recomendada por el fabricante). El amoníaco mostró una gran eficacia tanto a los 5 y 15 minutos de exposición. Los compuestos a base amonio cuaternario provocan la desnaturalización de proteínas y desestabilización de la membrana plasmática por su capacidad de modificación del pH (Martín-Blanco, 2004; Fraise, 2011). Presentan una alta capacidad fungicida y bactericida, por ello son ampliamente utilizados como desinfectantes en soluciones acuosas o mezclados con detergentes para la limpieza y desinfección de superficies (Rueda y col., 2001).

En el caso de la lejía se observó un efecto dependiente de la concentración y del tiempo de exposición, de forma que la mayor eficacia se observó con la exposición de las esporas a 0,8 g/l de cloro activo durante 15 minutos. Concentraciones y tiempos de exposición menores resultaron significativamente menos eficaces para matar las esporas de *N. ceranae*. Los compuestos a base de cloro (por ejemplo el dióxido de cloro) se han mostrado eficaces en la inactivación de esporas de *Nosema bombycis* (Zhengyong y col., 2010) y de otros microsporidios del género *Encephalitozoon* (Wolk y col., 2000). La acción desinfectante de este tipo de compuestos se debe a la actividad del cloro que es un fuerte agente oxidante. Estos productos son los desinfectantes más ampliamente utilizados por su amplio espectro de actividad microbiana y esporicida (Omidbakhsh, 2010).

Entre las soluciones comerciales ensayadas para desinfección de superficies se encuentra el Mycoplasma OFF™ (Minerva Biolabs, 32,5 % 1-propanol 18,0 % etanol 0,1 % glutaraldehído 0,05 % Mynox®) que mostró una alta eficacia esporicida a los 5 minutos de exposición. La aparente reducción de la eficacia a los 15 minutos se explica por el aumento de la destrucción celular (restos celulares), ya que no son detectables como esporas muertas por el citómetro.

En cuanto al resto de las sustancias analizadas como el Biocidal ZF™ (con componentes de amonio cuaternario), el Inouko®, el alcohol 96°, la povidona yodada y el ácido oxálico no mostraron un aumento significativo en la mortalidad de las esporas y por tanto no parecen adecuados para la eliminación de las esporas en el material apícola. El Inouko® es un producto desinfectante utilizado en limpieza de superficies ganaderas, cuyo componente principal es el peróxido de hidrógeno (25%). El peróxido de hidrógeno es capaz de hacer germinar las esporas de *N. ceranae* debido al choque osmótico que se genera en el exterior de la espora, provocando la extrusión del túbulo polar (Van Laere, 1976; Higes y col., 2006; Leiro y col., 2012). Esto hace pensar que podría ser un buen producto de acción esporicida, sin embargo la concentración evaluada en el este estudio no resultó eficaz aunque es posible que a concentraciones mayores si presente mejor eficacia.

Estudios realizados por Leiro y colaboradores (2012), demostraron que las esporas de microsporidios que infectan a peces (género *Spraguea*) expuestas a soluciones de etanol entre el 1 y 10% mostraban un alto porcentaje de extrusión del túbulo polar, en cambio con concentraciones mayores del 50% no observan modificaciones en las esporas. Estos resultados apoyan los obtenidos en este trabajo utilizando alcohol 96°, aunque nuestro estudio no permite evaluar las esporas vacías,

únicamente las vivas o muertas. Por otro lado la povidona yodada es un conocido desinfectante que a pesar de no mostrar eficacia esporicida frente a esporas de *N. ceranae* si manifestó una alta capacidad desincrustante lo que ayudaría a limpiar las superficies arrastrando el máximo de esporas.

Algunos estudios muestran la eficacia del ácido oxálico en el control de la nosemosis en las colonias de abejas (Nanetti y col., 2015), sin embargo en nuestro estudio el ácido oxálico no mostró ningún efecto sobre la viabilidad de las esporas. La administración de este tratamiento en las colonias de abejas se realiza a través de una solución azucarada que se gotea en la colmena, de forma que las abejas limpian el producto ingiriéndolo. Dada la ausencia de acción esporicida observada en el presente estudio, es posible que el efecto de la disminución de esporas de *N. ceranae*, observado por Nanetti y colaboradores (2015), se deba a cambios en el pH del ventrículo de la abeja ocasionados por la ingesta de ácido oxálico, que disminuye la viabilidad de las esporas dentro del mismo.

En el caso del ácido acético si bien no se observó un aumento significativo en la mortalidad de las esporas, sí que se observó un aumento considerable en los restos celulares y una reducción del número de eventos detectados por el citómetro de flujo. Probablemente esto es debido a una destrucción de las esporas en fragmentos, de tal forma que no permite una correcta cuantificación de las esporas muertas y destruidas. Esto indicaría una acción esporicida que confirma su ya conocida capacidad microbicida. El ácido acético es muy efectivo en la desinfección de material en clínica humana y animal (Cortesía y col., 2014, Berry y col., 2000) y es utilizado por apicultores para esterilizar los cuadros mediante fumigación (Ibrahim y col., 2010, Pernal y col., 2010) y recomendado por asociaciones de apicultores del Reino Unido, mediante la distribución de manuales de buenas prácticas que muestran como limpiar las herramientas apícolas, para prevenir la diseminación de los agentes patógenos entre colmenas ([www.bbka.org.uk](http://www.bbka.org.uk)), si bien su acción corrosiva debe tenerse en cuenta.

Para todas las sustancias evaluadas por contacto se recomienda después del tiempo de exposición, eliminar los residuos del desinfectante del material apícola, aclarando abundantemente con agua, dejando secar durante un tiempo antes de volver a usarlo.

En el caso de las harinas de *Brassica nigra* (glucosinolatos) cuyo efecto se evaluó por evaporación, estas mostraron solo un efecto microsporicida a las 24 horas de exposición, aunque muy inferior al producido por el amoníaco, lejía o Mycoplasma OFF™. Este es el primer trabajo que evalúa la capacidad esporicida frente a esporas de *N. ceranae* de un compuesto vegetal de acción por evaporación, por lo que sería interesante realizar más estudios aumentando el tiempo de exposición o la concentración de las harinas para determinar si estas sustancias serían eficaces para la desinfección de material apícola. Los glucosinolatos son metabolitos de defensa de las plantas contra patógenos y plagas. Son moléculas almacenadas en las vacuolas de la célula vegetal, y dependientes de la acción de la enzima mirosinasa. De manera que cuando un tejido vegetal se daña, los glucosinolatos entran en contacto con el agua citosólica y la mirosinasa, y la enzima rompe el glucosinolato liberando isotiocianatos, tiocianatos y nitrilos, componentes inestables y muy tóxicos (Vig y col., 2009; Jahangir y col., 2009) con importante capacidad anti-fúngica y anti-microbiana (Fahey y col., 2001; Vig y col., 2009). Estos productos son usados en agricultura ecológica (Lazzeri y col., 2000, 2010), además son recogidos activamente por las abejas en el polen de brasicáceas, que tienen una alta concentración de los mismos.



A pesar de que hay muchos métodos específicos para evaluar agentes esporicidas, no hay ninguno específico para microsporidios. En este trabajo, mediante la adaptación de un protocolo de desinfección de superficies basado en la Farmacopea Europea y las Normas UNE, se desarrolla por primera una metodología para la evaluación de la actividad esporicida de sustancias mayoritariamente de uso común frente a esporas de *N. ceranae*. La metodología diseñada es aplicable para la evaluación de sustancias de desinfección frente a otros organismos medioambientales de índole agrícola o ganadera.

En este trabajo se seleccionaron principalmente compuestos químicos que fuesen de fácil aplicación y adquisición por los apicultores. Trabajos anteriores evaluaron la capacidad de resistencia de las esporas ambientales de *Nosema* spp. a condiciones físicas que requieren instalaciones o equipamientos más complejos como la irradiación con un haz de electrones de 10 kGy, radiación ultravioleta, temperatura y desecación (Malone y col., 2001; Fenoy y col., 2009; Pernal y col., 2010; Gisder y col., 2010; Zheng y col., 2014; Sánchez-Collado y col., 2014), habiéndose demostrado que afectan a la viabilidad de *N. ceranae*.

Las técnicas profilácticas deben formar parte del control integral de enfermedades, incluyendo en los programas sanitarios la limpieza y desinfección con el propósito de impedir la entrada y difusión de un patógeno para minimizar el riesgo de infección en individuos sanos. En este trabajo todos los productos testados mostraron un cierto grado de actividad esporicida, aunque únicamente el amoníaco, la lejía, el ácido acético y el Mycoplasma OFF™ tuvieron gran eficacia microsporicida frente a esporas de *N. ceranae*. Futuros estudios deberían dirigirse al desarrollo de mecanismos de aplicación, que faciliten el manejo de estas sustancias por el apicultor y a la evaluación de su eficacia en distintos tipos de superficies más porosas como es el caso de la madera de la que generalmente están fabricadas las colmenas.



## CAPÍTULO II





## CAPÍTULO II

### Ensayos de aplicación de medidas metafilácticas y terapéuticas en base a sustancias de origen natural y sintético frente a la nosemosis C de *Apis mellifera*.

En la actualidad no existen en España medicamentos veterinarios registrados para el control de la nosemosis en las abejas melíferas. Debido a este vacío terapéutico, se han comercializado algunos productos como complementos alimentarios (ApiHerb®, Hive alive®, VitaFeed gold®, Nozevit®, etc., descritos en la revisión bibliográfica) publicitados como eficaces para el control de la nosemosis. Sin embargo se tiene una información limitada sobre su eficacia. Por ello, dada la alta prevalencia de *N. ceranae* en nuestro país y los efectos negativos que sobre la abeja individual y la colonia de abejas produce, la búsqueda de nuevas sustancias efectivas frente a este patógeno es un objetivo prioritario. De manera que este capítulo se ha dividido en:

- A) Selección de sustancias
- B) Ensayos de laboratorio
  - B.1) Ensayo de toxicidad y dosis máxima consumida
  - B.2) Ensayo de eficacia frente a *N. ceranae*
- C) Ensayos de campo







## CAPÍTULO II. A)

SELECCIÓN DE SUSTANCIAS

En la presente memoria la búsqueda de sustancias susceptibles a ser utilizados en el control la nosemosis se dirigió principalmente a sustancias de origen natural. En general este tipo de sustancias están incluidas en el anexo II del Reglamento CEE 2377/90, donde se establece el límite medio de residuos (LMR) de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal, como es la miel. La inclusión en este anexo facilita su posterior registro como medicamento veterinario.

Los siguientes compuestos se utilizan por primera vez en abejas como tratamiento frente a la nosemosis:

El **ácido tánico** es un compuesto polifenólico soluble en agua que se encuentra de forma natural en muchas especies vegetales con una función de defensa antimicrobiana (Chung, 1998), ya que son básicamente toxinas que muchos seres vivos no toleran. A diferentes concentraciones y condiciones alimentarias se ha visto que tiene propiedades saludables incluso para el ser humano gracias a su actividad antimicrobiana, capacidad antidiarreica (Van Ampting y col., 2010; Ren y col., 2012), incluso para el tratamiento en cicatrización de heridas (Ninan y col., 2016). De hecho, algunos metabolitos secundarios de las plantas como en este caso los taninos acaban en los productos elaborados por las abejas, como el polen (Kaur y col., 2013), previa recolección de los mismos en las plantas (Dutra y col., 2014).

El **carvacrol** es una molécula fenólica, que suele ser componente principal de muchos aceites esenciales. Son sustancias olorosas obtenidas de las plantas, que fundamentalmente son originadas como consecuencia del metabolismo secundario de los vegetales, con función de defensa o atracción. Se caracterizan por ser una mezcla de varios compuestos con aromas volátiles, con gran variedad de estructuras químicas. Los componentes mayoritarios de los aceites esenciales, pueden llegar al 85% del total y el resto se presentan como trazas que posiblemente ayuden a su efecto final de forma sinérgica. El carvacrol tiene un olor característico, que da el aroma a la planta del orégano, la cual contiene en altas concentraciones (Silva y col., 2016), además de encontrarse en muchas otras plantas (Al Hafi y col., 2016). El aceite esencial de orégano extraído de la planta *Origanum vulgare*, que ha demostrado tener un amplio espectro antimicrobiano y antifúngico, debido a su alto contenido en carvacrol (su componente principal) y timol (Larrondo, 1995; Knobloch, 1989; Dorman, 1999). De hecho las plantas aromáticas, han sido usadas tradicionalmente en medicina natural por su gran capacidad en la inhibición de bacterias, hongos, levaduras, y muchos animales como cestodos y ácaros (Burt y col., 2016; Erland y col., 2016; Fabbri y col., 2016; Shang y col., 2016).

Otro grupo de sustancias estudiadas fueron los **glucosinolatos**. Son compuestos procedentes del metabolismo secundario de las plantas con funciones diversas como la protección a frente a patógenos, plagas, etc. Por ello se les considera plaguicidas naturales (Vig y col., 2009). Son de estructura química tioglucosídica, cuya actividad es dependiente de las enzimas hidrolíticas denominadas mirosinasas, encargadas de la liberación de los tiocianatos que son las sustancias con propiedades biológicas (Fahey

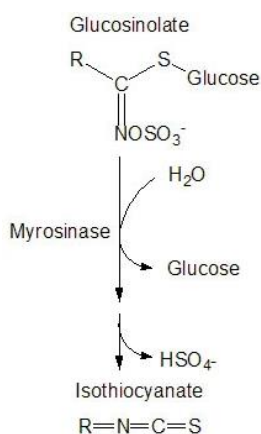
y col., 2001). Se encuentran principalmente en plantas dicotiledóneas, especialmente en aquellas de la familia *Brassicaceae* (crucíferas; Halkier y Gershenzon, 2006).

En los últimos años se han seleccionado varias plantas con alta concentración en glucosinolatos, cuyo extracto ha sido utilizado para biofumigación. Estos productos están registrados por el *Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria* (CREA, Bolonia, Italia) y se aplica en: a) el abono de plantas verdes con *Brassica juncea*, seleccionada por su alto contenido en el glucosinolato-sinigrina, obteniendo una gran cantidad de biomasa capaz de liberar alil-isotiocionato tras su picado; b) harinas de semillas de *Brassica carinata* formuladas por un procedimiento patentado (Lazzeri y col., 2010) que se utiliza en biofumigación en agricultura ecológica; c) productos líquidos de plantas hipogeas (plantas con cotiledones enterrados, cereales, guisante, roble...) en emulsión de aceite con semillas que tienen acción microbicida sobre algunos patógenos de plantas.

Estas sustancias se aplican actualmente en agricultura ecológica y nunca se han utilizado para apicultura, a pesar de que las abejas recolectan activamente el polen de las crucíferas como fuente de proteína y sus extractos podrían tener efectos potenciales sobre las abejas, así como sobre sus simbiontes y patógenos.

Como se ha mencionado, este compuesto se metaboliza gracias a la enzima mirosinasa (tioglucósido glucohidrolasa) que está presente en las células vegetales. Se encarga de la hidrólisis de los glucosinolatos en presencia de agua, proceso que suele ocurrir tras una rotura de la pared celular por el ataque de microorganismos o insectos. Esta reacción genera productos de hidrólisis, entre los que se encuentran los tiocianatos, nitrilos e isotiocianatos (figura 8. Vig y col., 2009; Jahangir, 2009). Estos productos volátiles, tienen importantes propiedades antifúngicas y antibacterianas, que inhiben el crecimiento y desarrollo de numerosos patógenos, además de tener capacidad anticancerígena (Hecht, 1995; Thalalay y Zhang, 1996; Hecht, 2000; Conaway, 2002; Fahey y col., 2001; Vig y col., 2009).

**Figura 8.** Mecanismo de liberación del tiocianato por la enzima mirosinasa.



También se ha considerado analizar otros productos de síntesis que ya están formulados como medicamentos veterinarios para otras ganaderías o como complementos alimenticios de consumo humano, cuyo LMR podría extrapolarse a la miel. Estos productos son el resveratrol, el ácido oxálico y el toltrazuril, sustancias que fueron utilizadas con anterioridad por otros autores (descrito en la revisión bibliográfica) con el fin de evaluar sus efectos en *A. mellifera iberiensis* en las condiciones controladas del laboratorio y con posterioridad en las condiciones ambientales de la Península ibérica.



## CAPÍTULO II. B)

### Ensayos de laboratorio: Toxicidad y dosis máxima consumida por *A. mellifera* de diferentes sustancias y eficacia en el control de *N. ceranae*.

Para que una sustancia determinada pueda ser utilizada vía oral en el control de algún agente patógeno en las abejas melíferas es fundamental que esta sustancia sea aceptada por las abejas, esto es, que la consuman adecuadamente y que no resulte tóxica a las dosis que pueda tener un efecto sobre el patógeno. Con la aplicación de la metodología descrita por las normas OECD (1998), se puede determinar ambos aspectos.

En este capítulo se determina la toxicidad, la dosis máxima consumida por las abejas y la eficacia en condiciones de laboratorio del ácido tánico, resveratrol, carvacrol, glucosinolatos, todos ellos de origen natural. También se evaluó el toltrazuril y el ácido oxálico sustancias activas de diferentes medicamentos veterinarios. Para ello este capítulo se divide en dos partes:

B.1) Ensayo de toxicidad y dosis máxima consumida

B.2) Ensayo de eficacia frente a *N. ceranae*

## CAPÍTULO II. B.1)

**MATERIAL Y MÉTODOS DEL ENSAYO DE TOXICIDAD Y DOSIS MÁXIMA CONSUMIDA****1. RECOGIDA DE ABEJAS PARA EL TRABAJO EN LABORATORIO**

Para la selección de las colonias de abejas se utilizó la metodología descrita por Higes y colaboradores, (2007) y Martín-Hernández y colaboradores, (2009). Las abejas utilizadas en estos ensayos procedían de colonias de *A. mellifera iberiensis* ubicadas en los colmenares experimentales del CIAPA. En concreto del colmenar denominado Valdeavero utilizado para los ensayos de laboratorio por mantenerse bajo un minucioso control, lo que determina un óptimo estado sanitario, ya que se mantiene libre de los principales patógenos que pueden afectar a las abejas melíferas, como *N. ceranae*, y *V. destructor* (este último controlado siguiendo el RD608/2006). Además se mantiene aislado de otros colmenares no controlados por los investigadores del CIAPA, y que pudieran ser fuente de reinfección.

De este colmenar se recogieron cuadros de cría operculados, que fueron transportados al laboratorio de patología en el mismo día.

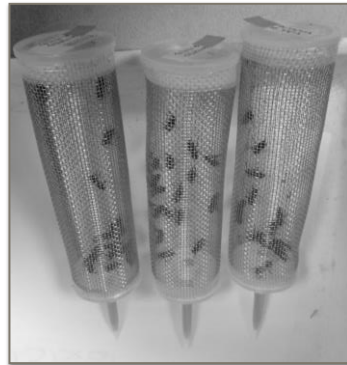
**2. RECOLECCIÓN DE ABEJAS: NACIMIENTO, MANEJO Y ENJAULADO DE LAS ABEJAS**

En el laboratorio los cuadros fueron mantenidos en una estufa (Memmert, UNB400) a temperatura constante de  $34 \pm 1^\circ\text{C}$ , para que se completara la metamorfosis del insecto, obteniendo de esta manera abejas adultas de edad conocida. Se siguió la metodología descrita por Higes y colaboradores (2007), para manejo de abejas en laboratorio. Las abejas recién nacidas (todas ellas de la misma edad  $\pm 1$  día) fueron extraídas del cuadro de cría, proporcionando un golpe seco en el lateral del cuadro de manera que las abejas caían a un recipiente, a partir del cual se fueron repartiendo aleatoriamente en jaulas individuales con 25 abejas cada una (figura 9). Las jaulas se mantuvieron en estufa a  $33^\circ\text{C}$ , y se alimentaron con jarabe (50% azúcar y 50% agua) suplementado con promotor L® (laboratorios Calier) como sustitutivo del polen. Todo el material estaba previamente limpio y desinfectado.

**3. CONDICIONES GENERALES DEL ENSAYO**

Las abejas, a los 5 días de la desoperculación se consideran abejas adultas en condiciones de ser utilizadas para los diferentes ensayos (Higes y col., 2013a). Para los ensayos de toxicidad y dosis máxima de consumo se utilizaron 3 jaulas (de 25 abejas) por sustancia y concentración, incluyendo los testigos correspondientes.

**Figura 9.** Jaulas utilizadas para los ensayos experimentales de laboratorio.



Todas las sustancias a ensayar se preparaban y administraban diluidas en una solución acuosa (jarabe; 50% azúcar, 50% agua). En el caso de algunas sustancias se realizaron una serie de adaptaciones en la preparación por las condiciones físico-químicas de las mismas que se comentarán más adelante. A los testigos se les administró el mismo jarabe pero sin tratamiento.

Se midió mortalidad a las 24, 48 y 72 horas post-administración, según indica la norma OECD en el caso de los tratamientos de bajo consumo. Los datos de mortalidad que se representan en los resultados se muestran como mortalidad acumulada, determinada por la suma de las mortalidades diarias en cada caso.

#### 4. ANÁLISIS DE TOXICIDAD POR VÍA ORAL

Para la determinación de la toxicidad se siguió la norma OECD nº 213 que establece la metodología de aplicación en abejas para evaluar sustancias administradas por vía oral. En todos los ensayos realizados se utilizaron abejas adultas, de 5 días tras la desoperculación y el ensayo tuvo una duración entre 48 hasta 96 horas. Según las indicaciones de la norma OECD, para aquellas sustancias que previsiblemente pudieran presentar reducida toxicidad, se realizó un ensayo a dosis única, mediante la administración de 100 µg por abeja de la sustancia en estudio. Si la mortalidad de abejas registrada tras la aplicación de la sustancia problema no es significativamente superior a la registrada en los testigos sin tratar, se considera que la sustancia en cuestión es inocua para las abejas y no se precisa la realización de una dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>). Con todas las sustancias analizadas (ácido tánico, resveratrol, carvacrol y toltrazuril) se elaboró un jarabe altamente concentrado de manera que la administración de 2 µl de la solución proporcionase los 100 µg por abeja a dosis única. En el caso de los glucosinolatos no se pudo realizar el análisis de toxicidad a las concentraciones que marca la norma OECD debido a la naturaleza de las sustancias que se explican más adelante.

Para la administración de la dosis única, se dispuso directamente en el aparato bucal, estimulándole la probóscide con la micropipeta, una dosis de 100 µg por abeja de cada una de las sustancias, en abejas levemente anestesiadas con CO<sub>2</sub> (Higes y col., 2007).

#### Sustancias testigo para el ensayo de toxicidad:

La norma OECD indica la inclusión de un grupo testigo positivo de toxicidad tratado con dimetoato (PESTANAL®, Sigma-Aldrich cuya dosis letal 50 es de 0,10 - 0,35 µg/abeja), cuya función es confirmar que el método empleado permite reproducir la muerte de abejas si las sustancias utilizadas fueran tóxicas. En este ensayo se empleó una solución de 0,10 mg/ml de dimetoato en jarabe líquido. Del mismo modo que para las sustancias de estudio, se administró a cada abeja 2 µl en el aparato bucal de esta solución. El testigo negativo consistió en abejas alimentadas con 2 µl del jarabe líquido que se describió anteriormente.

### 5. ANÁLISIS DE DOSIS MÁXIMA CONSUMIDA POR LAS ABEJAS

Mediante este ensayo se evaluó la cantidad máxima de cada sustancia diluida en jarabe y administrada *ad libitum* que las abejas son capaces de consumir. En este trabajo se tuvo en cuenta el consumo medio de jarabe de una abeja al día, del que dependerá la cantidad final de la sustancia activa que tome cada abeja. Este consumo diario es muy variable, siendo el promedio de jarabe consumido al día de aproximadamente de 15-25 µl/día de manera que dependiendo del grado de aceptación del alimento se debe preparar a mayor o menor concentración (tabla 2). El consumo y la mortalidad fueron evaluados diariamente. El consumo se muestra en los resultados como *consumo acumulado*, que es la cantidad de producto ingerida por una misma abeja durante el ensayo, y *mortalidad acumulada*, que el número de abejas muertas en cada tratamiento a lo largo del ensayo.

**Tabla 2.** Cantidad de jarabe que ha de consumirse para recibir la dosis de 100 µg de principio activo (sustancia).

| <i>Consumo abeja/día ( µl)</i> | <i>Concentración tratamiento ( µg/ µl= g/l)</i> | <i>µg Principio activo</i> |
|--------------------------------|---|----------------------------|
| 45                             | 2,2   | 100                        |
| 40                             | 2,5   | 100                        |
| 35                             | 2,9   | 100                        |
| 30                             | 3,3   | 100                        |
| <b>25</b>                      | <b>4,0</b>                                      | <b>100</b>                 |
| <b>20</b>                      | <b>5,0</b>                                      | <b>100</b>                 |
| <b>15</b>                      | <b>6,7</b>                                      | <b>100</b>                 |
| 10                             | 10,0  | 100                        |
| 5                              | 20  | 100                        |
| 2                              | 50  | 100                        |

\*Ejemplo: Si una abeja toma al día 25 µl de tratamiento cuya concentración es de 4 g/l, estará tomando 100µg de la sustancia a analizar. Resaltado en negrita son las concentraciones habituales de consumo.

Teniendo en cuenta esta variabilidad en el consumo diario de alimento por abeja, se debe analizar un rango de concentraciones amplio, con el fin de evaluar la dosis máxima que ingiere del producto la abeja, intentando proporcionar la dosis máxima recomendada por la norma OECD.

Debido a la procedencia de algunos de los productos con los que se trabajó, la administración de las sustancias se realizó principalmente vía oral en jarabe y suministradas *ad libitum*, como indica la norma OECD. En el caso de los glucosinolatos la administración se realizó utilizando como vehículo un alimento semi-sólido o *candy*.

#### Sustancias testigo para el ensayo de dosis máxima ingerida:

De nuevo se utilizó la concentración de dimetoato indicada por la norma OECD, a la misma concentración que en el ensayo de toxicidad, pero esta vez suministrada vía oral en alimentadores colectivos *ad libitum* (figura 9). Por otro lado, como testigo positivo se utilizó una solución de fumagilina a una concentración de 120 mg/l en jarabe, según se describe en Higes y colaboradores (2009), dado que esta sustancia podría considerarse de referencia debida a su baja toxicidad para las abejas y su conocida acción sobre el desarrollo de *Nosema spp.* Como testigo sin tratamiento se utilizó el jarabe líquido que se usó como diluyente de los tratamientos, o jarabe semi-sólido (*candy*).

## 6. ADAPTACIONES ESPECÍFICAS PARA CADA SUSTANCIA

Las adaptaciones llevadas a cabo en las sustancias evaluadas se detallan en la tabla 3 y para los glucosinolatos en la tabla 4.



Tabla 3. Condiciones de las sustancias ensayadas

Dosis máxima consumida

| Producto      | Rango concentraciones evaluadas |         |          |   |                    | Común en todos los grupos   | Suministrador                              |
|---------------|---------------------------------|---------|----------|---|--------------------|---|--|
| Ácido tánico  | 50 g/l                          | 25 g/l  | 12,5 g/l | 6 g/l                                       | 4 g/l              | Tiempo de exposición: 24, 48 y 72 horas<br>Tiempo de evaluación: 24, 48 y 72 horas<br>Alimento utilizado: jarabe de agua y azúcar (1:1) | Sigma-Aldrich® 99%                         |
|               | 2,5 g/l                         | 2 g/l   | 1,5 g/l  | 1 g/l                                       | 0,5 g/l            |   | MegaResveratrol® 99%<br>(Danbury, Ct, USA) |
| Resveratrol   | 7 g/l                           |         |          |   |                    |   | Ecoxal® (CEVA)                             |
| Ácido oxálico | 6,66 g/l                        |         |          |   |                    |   |  |
|               | 0,13 g/l                        |         |          |   |                    |   |  |
| Carvacrol     | 2,5 g/l                         | 2 g/l   | 1,5 g/l  | 1 g/l                                       | Sigma-Aldrich® 99% |   |  |
|               | 0,8 g/l                         | 0,4 g/l | 0,2 g/l  |   |                    |   |  |
| Toltrazuril   | 7 g/l                           | 80 mg/l | 20 mg/l  | Cevazuril® (CEVA);<br>Toltrazuril 50 mg/ml) |                    |   |  |
| Fumagilina    | 120 mg/l                        |         |          |   |                    |   | FUMIDIL B® (CEVA)                          |



Además de los datos proporcionados en la tabla 3, a continuación se describen algunos datos de interés para cada sustancia:

Ácido tánico. El rango de concentraciones utilizado en este caso, se debe a las diferencias de consumo en las abejas (tabla 2) y por la difícil solubilidad del ácido tánico en el jarabe a altas concentraciones.

Resveratrol. Compuesto ya utilizado con anterioridad en este equipo (CIAPA, Informe proyecto RTA 2009-00105-C02), de manera que se utilizó la concentración de 7 g/l estimando, en principio, un bajo consumo (aproximadamente 10-15 µl jarabe, tabla 2).

Ácido oxálico. Al encontrarse formulado como medicamento veterinario específico para abejas, se administró la dosis recomendada por el fabricante de 6,66 g/l (Ecoxal®, Ceva). No obstante, pruebas realizadas previamente en laboratorio mostraron un bajo consumo cuando se ofrece a las abejas por vía oral y *ad libitum*, de manera que se administró paralelamente una solución de ácido oxálico más diluida del 0,13 g/l (procedente de una dilución al 2% de la recomendada por el fabricante).

Carvacrol. La solubilidad del compuesto en jarabe es baja por tratarse de un aceite, complicando su solubilidad en jarabe. Por ello, se diluyeron pequeñas cantidades de carvacrol en jarabe (1:1 azúcar y agua) con la ayuda de lecitina de soja como emulsionante. Se estableció el siguiente rango de soluciones: 2,5 g/l, 2 g/l, 1,5 g/l, 1 g/l, 0,8 g/l, 0,6 g/l, 0,4 g/l y 0,2 g/l que se administraron *ad libitum*.

Toltrazuril. Para este ensayo se utilizó el medicamento Cevazuril® (Ceva®). Sustancia evaluada con anterioridad en el laboratorio del CIAPA. Se ensayó la dosis de 7 g/l, asumiendo que consumen la mínima cantidad de tratamiento (tabla 2). Además, se analizaron las dosis de 80 mg/l y 20 mg/l, que fueron elegidas por aproximación a los resultados obtenidos por Rodríguez y col., 2009 en campo donde suministraron 100 mg/l por colmena.

Glucosinolatos. En este ensayo se trabajó con dos formulaciones distintas de glucosinolatos. La primera de ellas eran harinas obtenidas de la molienda de plantas brasicáceas (tabla 4) con concentraciones de glucosinolatos variables debido a su procedencia natural. Estas harinas eran después mezcladas con el alimento semi-sólido para su administración. Parte de las harinas obtenidas fueron sometidas a un proceso de desactivación de la enzima mirosinasa (vegetal) mediante su autoclavado. De esta forma se trabajó con harinas activadas (sin autoclavar) y desactivadas (autoclavadas). Las harinas activadas fueron ensayadas por el grupo CREA (Bologna-Italia, datos no mostrados), y las harinas desactivadas fueron enviadas a España para su análisis de en CIAPA.

La segunda formulación fue cedida por el laboratorio de Química Analítica de la Universidad de Valladolid (grupo TESEA). Estos compuestos procedían de una extracción química pura de dos tipos de glucosinolatos; sulforafano y glucorafanina (tabla 4) en solución acuosa.

La naturaleza de los productos suministrados por ambos laboratorios nos limitó la posibilidad de modificar las concentraciones para poder aplicar las recomendaciones de la norma OECD. De manera que las harinas fueron mezcladas al 4% y 8% homogéneamente junto a alimento semi-sólido (*candy*) comercial normal y alimento semi-sólido comercial enriquecido suministrado por laboratorios Calier. Debido a las limitaciones de las harinas y no poder administrar 100 µg de glucosinolato por abeja, este

producto solo se analizó en el ensayo de dosis máxima consumida. En cambio el sulforafano y glucorafanina fueron directamente administrados en la boca con 2 µl por abeja sin diluir en jarabe, ya que los productos administrados estaban muy poco concentrados.

Tabla 4. Condiciones evaluadas en los glucosinolatos.

| Dosis máxima consumida GLUCOSINOLATOS  |                                  |       |                       |                                      |
|--|----------------------------------|-------|-----------------------|--------------------------------------|
| Harinas desactivadas<br>(CIAPA Marchamalo)   | <i>Brassica nigra</i>            | SIN   |                       |                                      |
|  | <i>Eruca sativa spp oleifera</i> | ERU   | 4 % y 8 %             | ad libitum<br>(alimento semi-sólido) |
|  | <i>Lepidium sativum</i>          | GLT   |                       |                                      |
|  | Testigo (Candy)                  | Candy |                       |                                      |
| Glucosinolatos puros<br>Lab. Química Analítica de la<br>Universidad de Valladolid<br>(grupo TESEA) | Sulforafano                      |       | 776 ppm y<br>240 ppm  | 2µL en aparato bucal                 |
|  | Glucorafanina                    |       | 1300 ppm y<br>590 ppm |                                      |

\*10.000 ppm = 1 %

7. ANÁLISIS DE TOXICIDAD POR CONTACTO (ESPECÍFICO PARA ÁCIDO OXÁLICO)

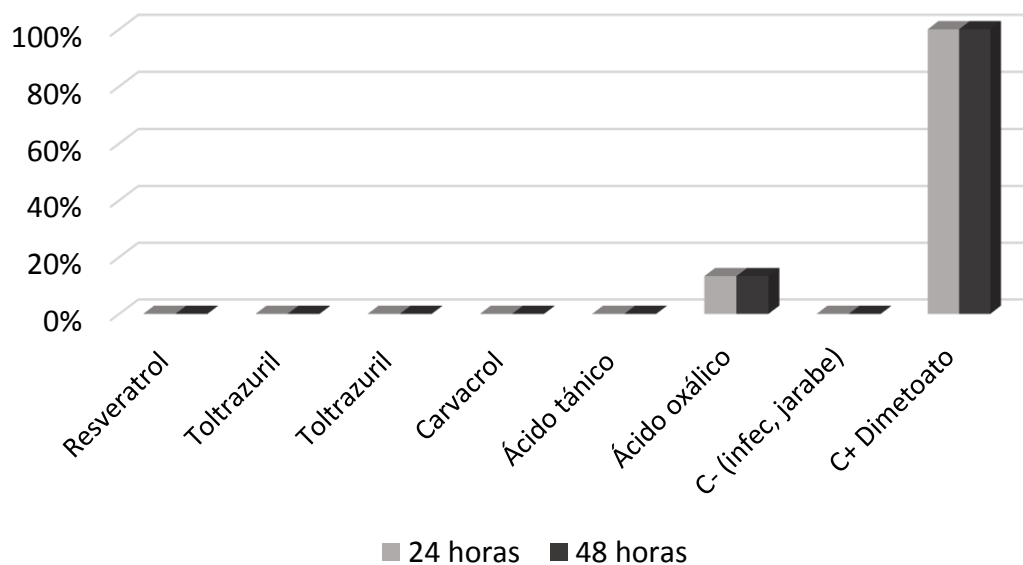
En el caso del ácido oxálico, además del análisis de toxicidad vía oral, se utilizó esta variante del análisis de toxicidad para simular la ingestión que se produce naturalmente cuando se aplica el tratamiento contra *V. destructor* en condiciones de campo. Para la determinación de la toxicidad por contacto se siguieron las normas descritas en la norma OECD nº 214. Se preparó la misma concentración utilizada para el ensayo de toxicidad oral, 100 µg de ácido oxálico por abeja en 2 µl (diluido en jarabe), que se dispensaron cuidadosamente en el tórax de abejas levemente anestesiadas con CO<sub>2</sub> (Higes y col., 2007). Para ello se utilizaron 3 jaulas con 15 abejas cada una.

## RESULTADOS DEL ENSAYO DE TOXICIDAD Y DOSIS MÁXIMA CONSUMIDA

### 1. ENSAYO DE TOXICIDAD VÍA ORAL

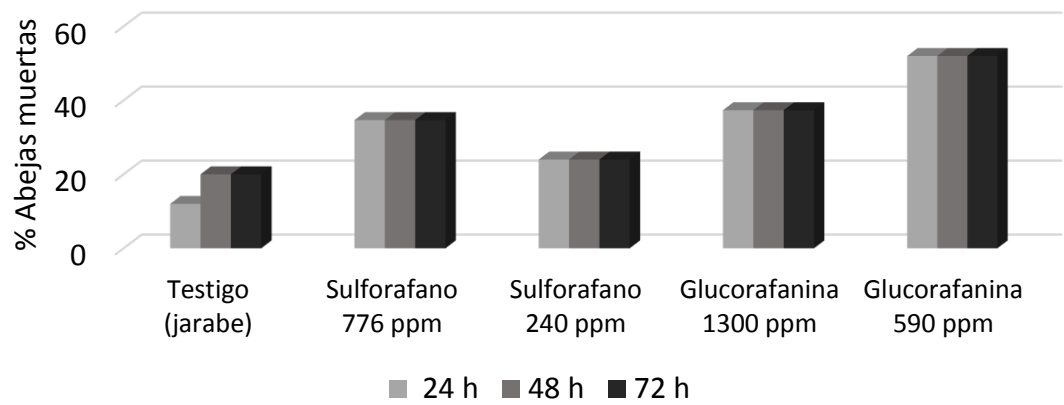
En el caso del ácido tánico, el resveratrol, el carvacrol y el toltrazuril el porcentaje de mortalidad fue 0% a 24 y 48 horas al igual que en el testigo negativo (solo jarabe). Esto indica que estas sustancias pueden considerarse inocuas para las abejas. En el caso del testigo al que se le administró el insecticida dimetoato se obtuvo, según lo esperado, una mortalidad del 100 % a las 24 horas (figura 10). Para el ácido oxálico, la mortalidad de las abejas del ensayo de toxicidad vía oral fue del 13,3 % (figura 10).

**Figura 10.** Mortalidad acumulada ensayo toxicidad vía oral.



En el caso de los glucosinolatos suministrados por el CREA, como se ha mencionado anteriormente, no se pudo realizar un análisis de toxicidad tal como marca la norma OECD 213, por no disponer de la sustancia pura, sino de un extracto natural de concentración variable. En cambio la formulación aportada por el grupo TESEA, si era de extractos puros, sulforafano y glucorafanina, de manera que la administración fue directamente, sin diluir en jarabe, en el aparato bucal (2 µl por abeja). La mortalidad fue muy elevada en la mayoría de los casos (figura 11). El sulforafano 240 ppm provocó la mortalidad más baja (27,3%) que el resto junto al testigo que fue del 15,2% y la glucorafanina superó el 50% de mortalidad.

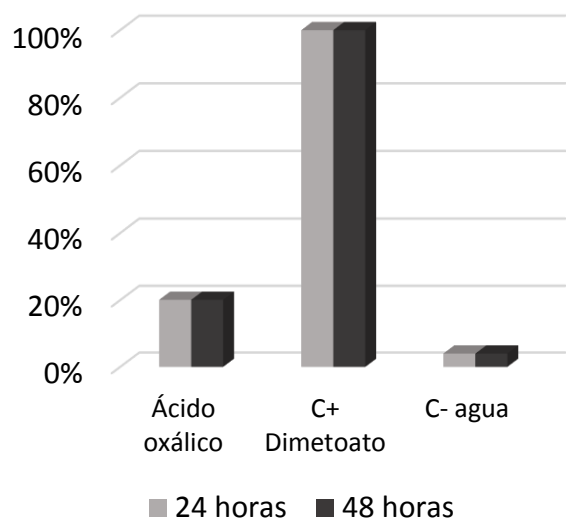
**Figura 11.** Mortalidad acumulada de las abejas tratadas con glucosinolatos administrados oralmente (grupo TESEA).



2. ENSAYO DE TOXICIDAD POR CONTACTO

En el ensayo por contacto para el ácido oxálico se obtuvo una mortalidad del 20,1% a las 24 horas (figura 12), inferior al registrado en el grupo tratado con dimetoato que fue del 100%.

**Figura 12.** Mortalidad acumulada ensayo toxicidad por contacto del ácido oxálico.



### 3. ENSAYO DE DOSIS MÁXIMA CONSUMIDA

Para establecer la dosis máxima consumida de cada producto se utilizaron los datos de 3 replicados a las 24, 48 y 72 horas. Los microgramos de cada sustancia (principio activo) consumidos por las abejas, se calcularon dividiendo el consumo registrado en los alimentadores colectivos de cada jaula, dividido el número de abejas que quedaban vivas en cada punto de muestreo. En el caso del alimento semi-sólido (glucosinolatos), el cálculo se realizó por diferencia de pesada.

El consumo del ácido tánico fue muy bajo a las 24 horas, de manera que se mantuvo más tiempo (hasta 72 horas) como marca la norma OECD para conseguir que ingiriesen la máxima cantidad de producto.

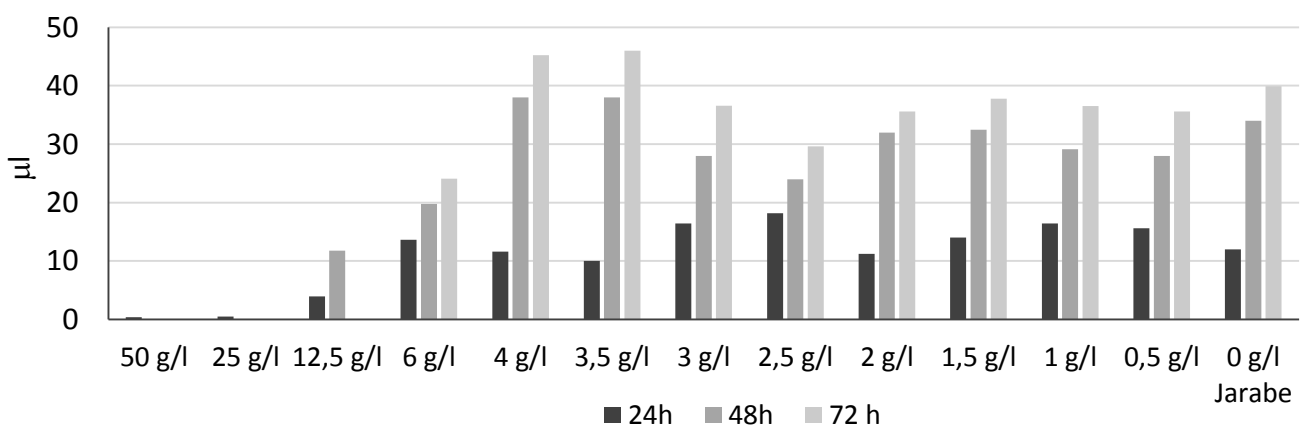
Desde las dosis más bajas (0,5 g/l) hasta 4 g/l el consumo de alimento fue muy alto siendo muy similar a la cantidad consumida por el testigo jarabe (figura 13). Y en consecuencia, las cantidades de ácido tánico consumido fue también mayor en la dosis de 4 g/l (figura 14).

En las dosis superiores se observó un rechazo del alimento, que era menor según se disminuía la concentración, aumentando el consumo del alimento y en consecuencia del ácido tánico (figura 13 y 14). De hecho los mayores consumos se observaron a 3,5 g/l y 4 g/l, y la mayor dosis de ácido tánico consumido fue a las concentraciones de 4 g/l, 3 g/l y 12,5 g/l (en las dosis altas, la muerte se produce por el reducido consumo de tratamiento).

La mortalidad de las abejas (figura 15) fue muy baja o incluso nula hasta la dosis de 3,5 g/l, siendo muy alta a partir de esta dosis (siempre mayor al 70%, nuevamente por el reducido consumo).

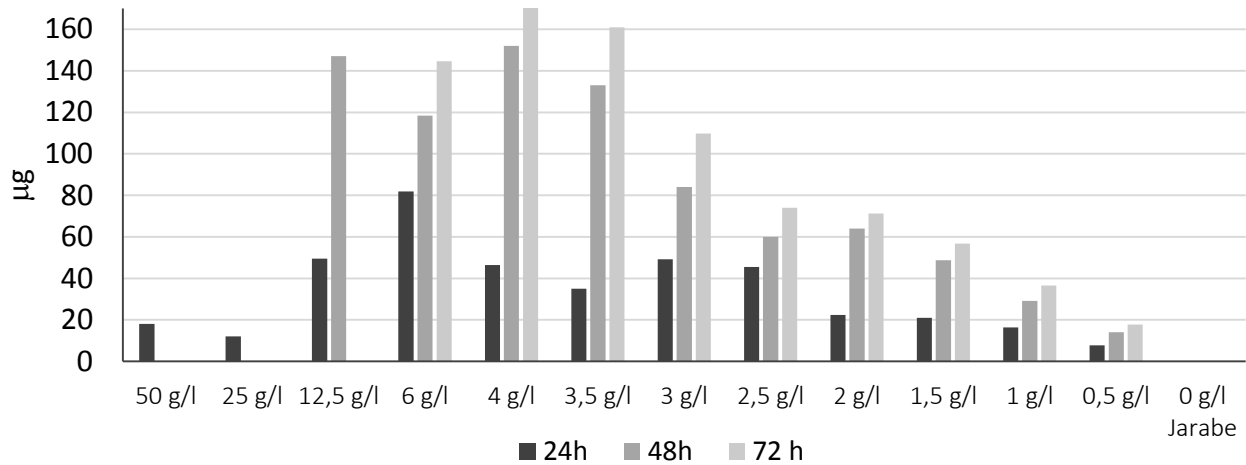
De manera que la concentración de 3,5 g/l fue la elegida para posteriores estudios de laboratorio, por su buena aceptación por las abejas, sin constatare un aumento de mortalidad respecto al control negativo. La concentración de 3,5 g/l fue la concentración que mayor consumo por abeja tenía, ingiriendo más de 25 µl de tratamiento por abeja, y la dosis máxima final de ácido tánico mayor a 100 µg.

**Figura 13.** Consumo de tratamiento con ácido tánico acumulado.



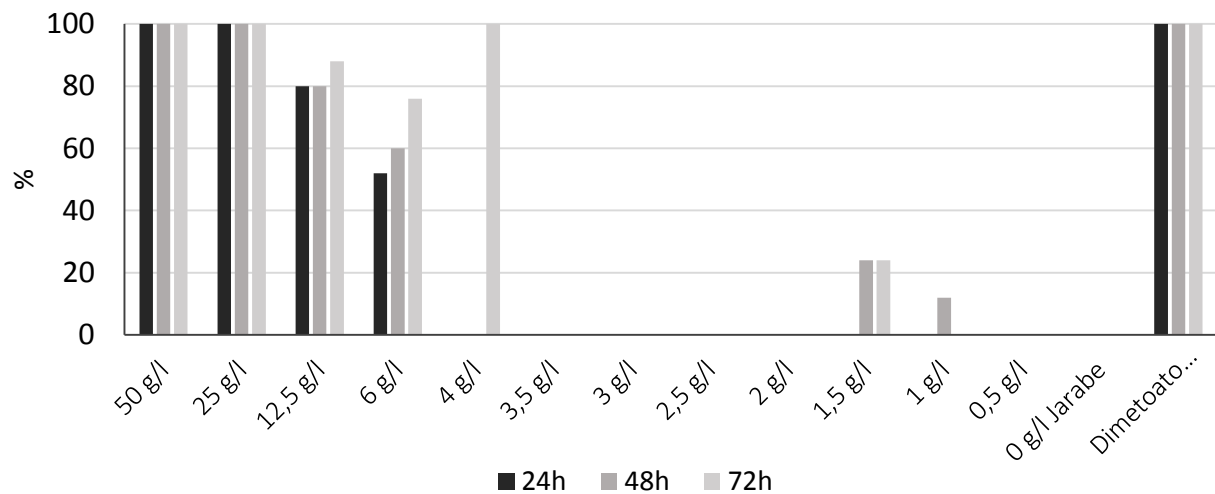
\* Valor promedio obtenido de 75 abejas (3 jaulas) evaluadas en cada punto de muestreo.

Figura 14. Microgramos (µg) totales de ácido tánico consumidos.



\* Valores promedio obtenido de 75 abejas (3 jaulas) evaluadas en cada punto de muestreo.

Figura 15. Mortalidad acumulada por el consumo del tratamiento con ácido tánico.



\* valores promedio obtenido de 75 abejas (3 jaulas) evaluadas en cada punto de muestreo.

En el resveratrol presentó, al igual que en ensayos previos realizados en el CIAPA, una gran aceptabilidad por las abejas, de manera que la cantidad final consumida de este tratamiento fue muy elevada (13,6 µl a las 24 horas, de 47,8 µl a las 48 horas y de 83,8 µl por abeja a las 72 horas, que equivale a 95,3 y 586 µg de resveratrol respectivamente). Además no se produjo ninguna mortalidad a lo largo del ensayo comparado con el testigo sin tratar, al que se le administraba solo jarabe, lo que confirma su inocuidad incluso a las altas dosis ingeridas (figura 16 y 17). Se seleccionó la concentración de 7 g/l que con un consumo reducido equivale a los 100 µg/abeja indicados en la norma OECD para los siguientes estudios desarrollados.

Como se ha indicado anteriormente, en el caso del toltrazuril se analizaron diferentes concentraciones. La primera de ellas fue 7 g/l, que al igual que en el resveratrol con un consumo reducido equivale a los 100 µg/abeja indicados en la norma OECD, y las concentraciones de 80 mg/l y 20 mg/l por aproximación a los estudios realizados por Rodríguez y colaboradores (2009). El consumo de alimento con las concentraciones más bajas (80 y 20 mg/l) fue superior al del tratamiento más concentrado (7g/l), sin embargo a bajas concentraciones la cantidad de producto activo consumido fue inferior a los 100 µg/abeja que además habían demostrado ser inocuas en las abejas. Solo a la concentración de 7 g/l se alcanzó la dosis de producto consumido de 100 µg/abeja o superior (figura 16 y 17). De esta forma, la dosis elegida para posteriores ensayos fue de 7 g/l, ya que es la primera concentración máxima ingerida voluntariamente y no tóxica en administración repetida.

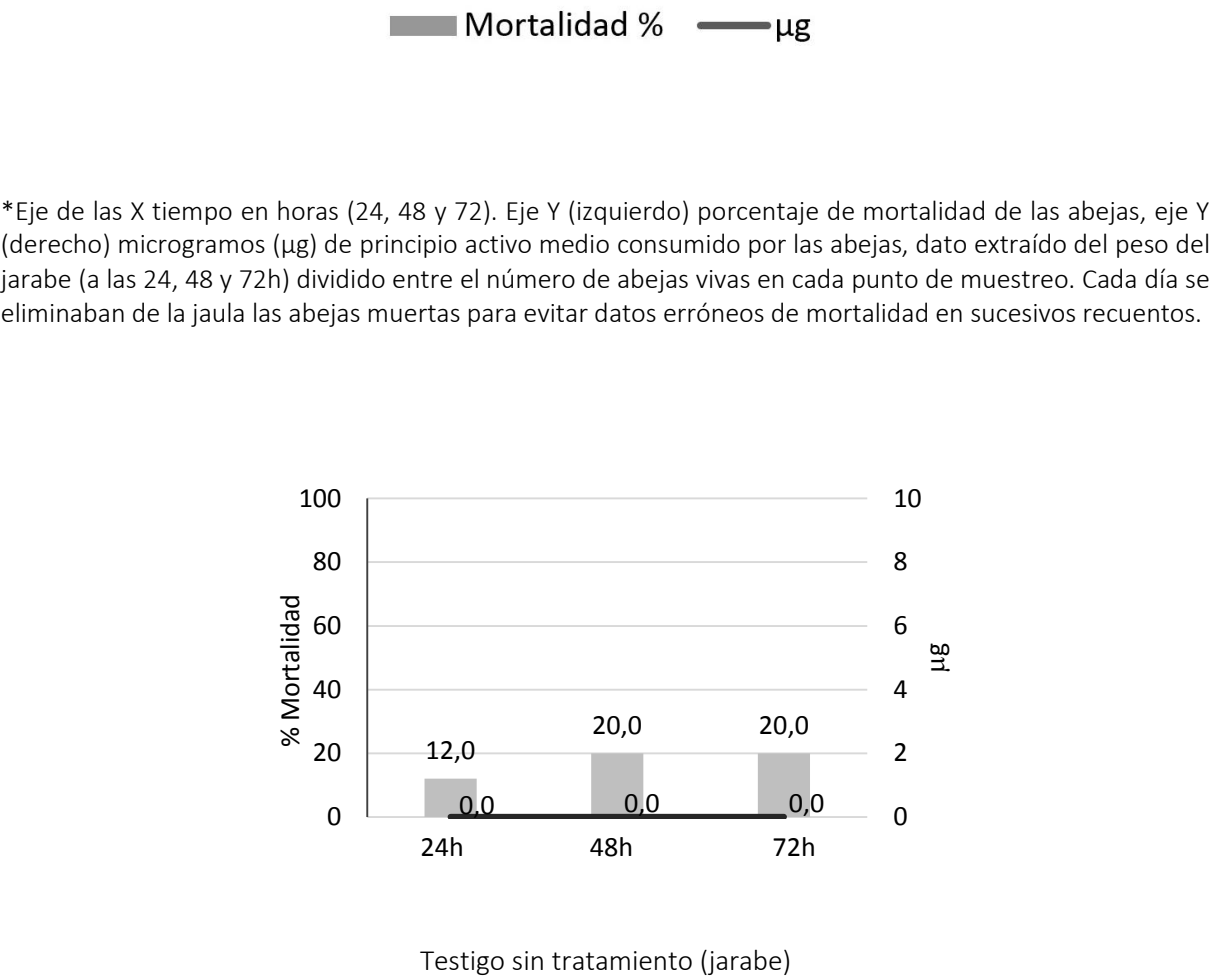
La insolubilidad del carvacrol ocasionó que la concentración máxima a la que se consiguió diluir el producto fue 2,5 g/l con ayuda de lecitina de soja. Sin embargo fue con la solución más diluida (0,2 g/l) la única que no superó el 8% de mortalidad a las 72 horas, mucho más bajo que los testigos (jarabe y fumagilina), además mostró la mayor ingesta llegando a 15 µg de principio activo consumido. Se intentó probar todo el rango de soluciones (2,5 g/l a 0,4 g/l) pero con el paso del tiempo, la fase acuosa se separaba de la oleaginosa, de forma que solo se analizó la dosis de 0,2 g/l (figura 16 y 17).

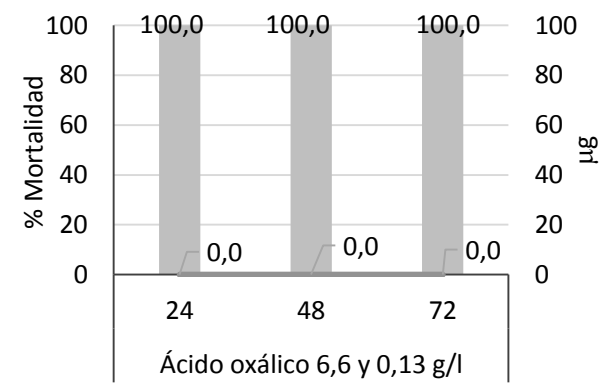
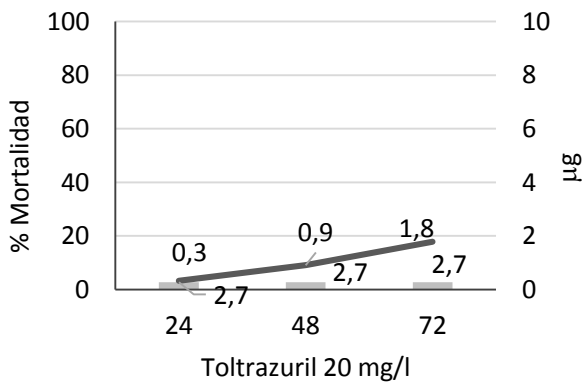
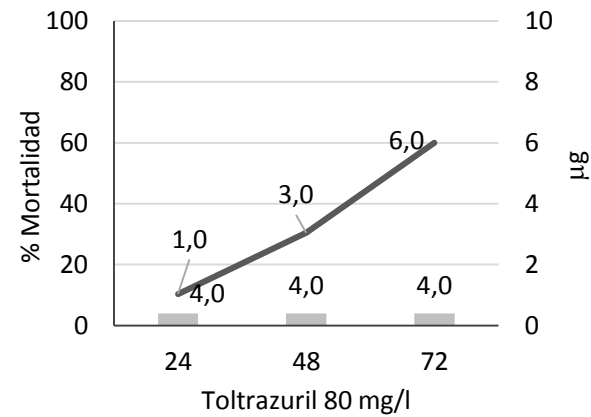
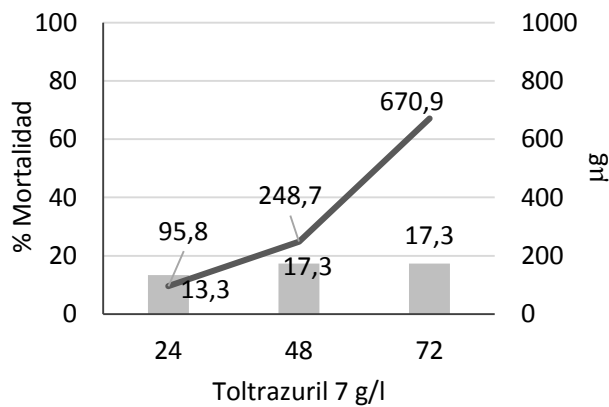
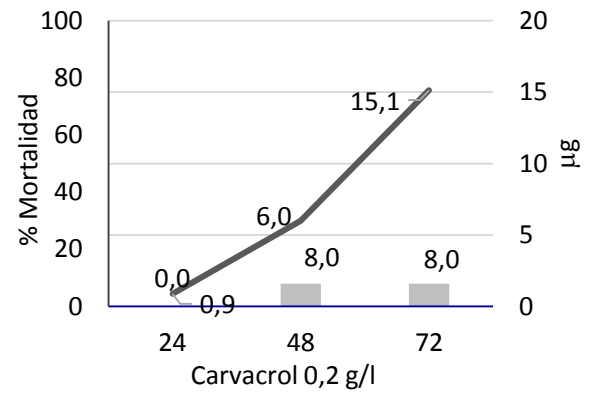
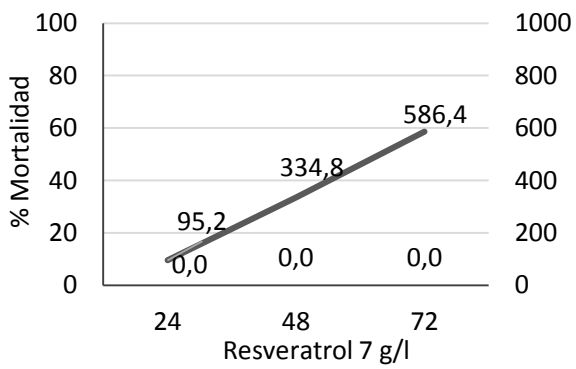
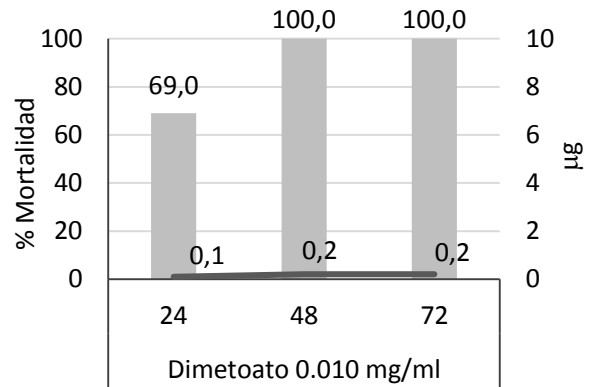
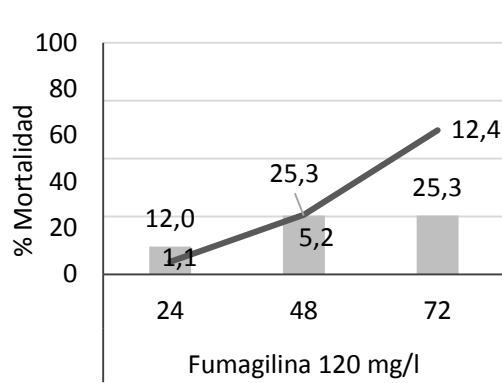
Las jaulas de abejas alimentadas con ácido oxálico al 6,6 g/l y 0,13 g/l la mortalidad fue del 100% ya que no consumieron el alimento. Este ensayo se repitió 4 veces, obteniendo los mismos resultados de mortalidad causada por no ingerir el alimento (figura 16).

Las jaulas con abejas tratadas con fumagilina y las testigos sin tratamiento (jarabe) mostraron una mortalidad y un consumo similar (figura 16 y 17).

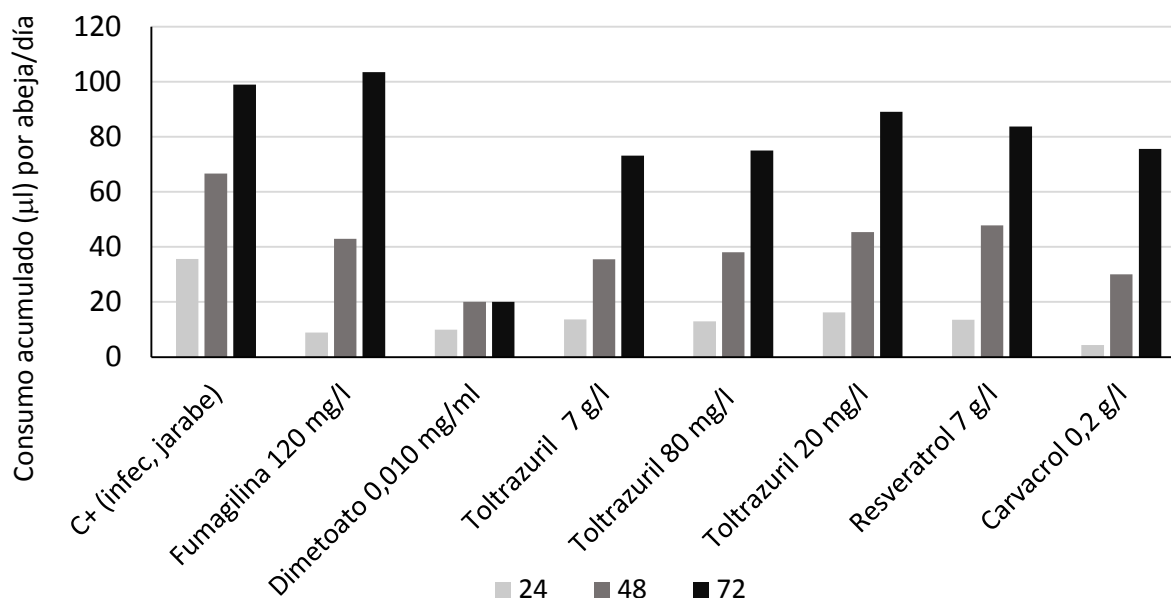


**Figura 16.** Representación del porcentaje de mortalidad (barras verdes) y consumo en microgramos (línea azul) de principio activo por tratamiento.





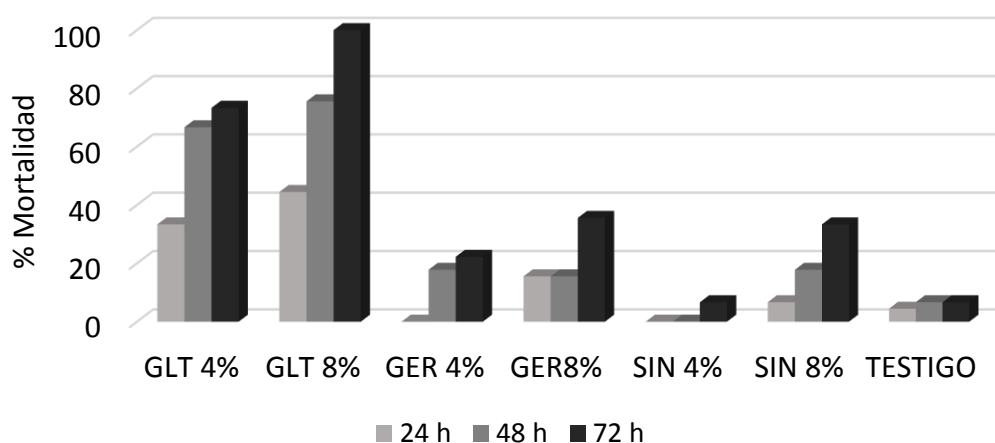
**Figura 17.** Consumo del tratamiento por abeja y día.



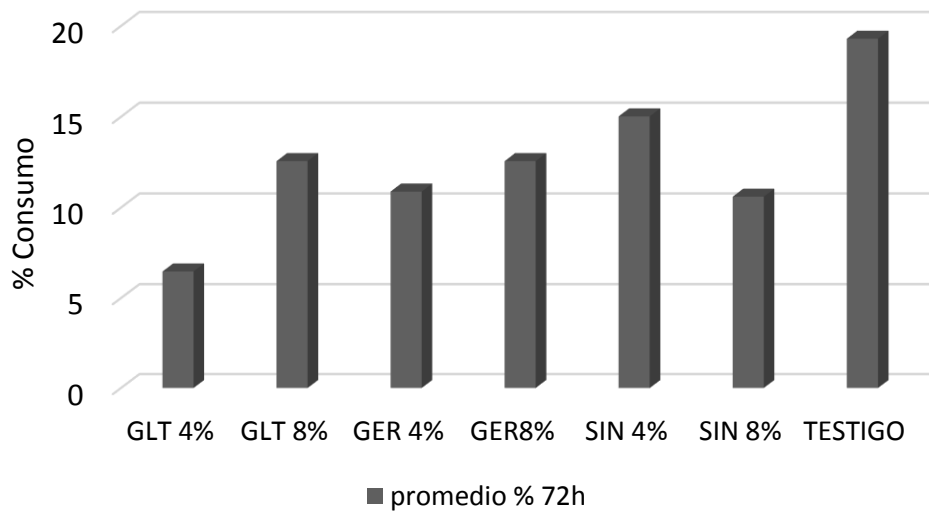
Los datos obtenidos a las 72 horas con los glucosinolatos muestran un consumo muy reducido por las abejas durante el ensayo. Sin embargo la harina compuesta por SIN 4 %, fue la que produjo menos mortalidad (7% a las 72 horas) y que mayor consumo obtuvo (15% del alimento consumido a las 72 horas) junto con el testigo sin tratamiento (7% mortalidad y 19 % consumo de alimento semi-sólido/*candy*). No obstante en este consumo hay que tener en cuenta que la diferencia de peso, en gran parte, se debe a la pérdida de agua del alimento, ya que visualmente el alimento semi-sólido (*candy*) en algunos casos estaba intacto, lo que reduce aún más el consumo y por ello no se pudo calcular la cantidad real consumida por cada abeja (figura 18 y 19).

Los resultados obtenidos en los ensayos realizados en el CREA (Bolonía) con las harinas activadas señalan que, al igual que con las desactivadas utilizadas en este trabajo, las harinas de *B. nigra* al 4 % es la harina que más aceptación tiene por parte de las abejas.

**Figura 18.** Porcentaje de mortalidad acumulada tras el consumo de harinas.



**Figura 19.** Consumo de tratamiento con glucosinolatos a las 72 horas.



\*Porcentaje de consumo promedio de 2 g de tratamiento a las 72 horas.

Debido al bajo consumo de estas harinas (<20%, figura 19) se seleccionó la harina que menor toxicidad mostró (SIN 4%) para mezclarlo con un alimento semi-sólido suplementado y elaborado por los laboratorios Calier. De esta manera se mejoró notablemente el consumo al 100% tanto en SIN 4% como en el testigo (solo alimento) a las 24 horas (datos no mostrados) y al consumir todo la pérdida de agua no fue relevante. La mortalidad fue similar al ensayo anterior (7% a 72 horas) desarrollado con alimento semi-sólido convencional. De manera que se eligió SIN 4 % para posteriores ensayos.

### DISCUSIÓN DEL ENSAYO DE TOXICIDAD Y DOSIS MÁXIMA CONSUMIDA

La evaluación de la toxicidad y consumo de un tratamiento es importante para adecuar su uso en condiciones de campo. El estado fisiológico de las abejas es determinante, ya que no se comportan igual las abejas de otoño-invierno que las de primavera-verano (Maurizio, 1950; Martín-Hernández y col., 2007). Estas diferencias repercuten en el consumo del producto además de la toxicidad del mismo por exceso de consumo si así fuese. En este trabajo todos los análisis se realizaron con abejas de primavera-verano y el consumo del alimento en los testigos fue homogéneo, no siendo así en los grupos alimentados con las distintas sustancias. En este trabajo el ácido tánico, resveratrol, carvacrol, toltrazuril y ácido oxálico resultaron inocuos para las abejas.

El **ácido tánico** es reconocido en salud humana por su actividad antimicrobiana y antifúngica (Chung y col., 1998; Ren y col., 2012), procede de vegetales que principalmente lo acumulan en los frutos y que el ser humano obtiene tras su consumo. Santoro y colaboradores (2004) administraron diferentes dosis de ácido tánico (1,5%, 2,5%, y 3,75% de ácido tánico en *candy*) a abejas mantenidas en condiciones de laboratorio y observaron una mortalidad superior al 50% en todas las dosis suministradas, al contrario que este trabajo donde la mortalidad fue dependiente de la dosis, sobre todo en dosis altas. De hecho a mayor dosis mayor mortalidad, bien por la toxicidad del ácido tánico a altas concentraciones como ocurre en 6 g/l y 4 g/l, o bien por el rechazo del alimento como se observa en las concentraciones mayores a 12,5 g/l donde hay bajo consumo y alta mortalidad. En el trabajo de Santoro y colaboradores (2004) no se detallan los valores de consumo del tratamiento, lo que podría explicar las diferencias en la mortalidad observada. Finalmente la concentración de 3,5 g/l de ácido tánico fue la elegida para posteriores estudios de laboratorio, por su alto consumo y baja toxicidad, ya que fue la concentración que mayor consumo por abeja mostró y que no produjo mortalidad significativa.

El **resveratrol** es otro componente de origen vegetal que en terapia humana está resultando muy eficaz en ensayos con células cancerígenas (Kim y col., 2016; Tino y col., 2016). Es un antioxidante con infinidad de beneficios frente a disfunciones generadas por la edad del individuo (Weiskirchen y col., 2010; Fernández-Mar y col., 2011; Baltaci y col., 2016). Esta sustancia se ha encontrado en diferentes concentraciones en el polen que consumen las abejas (Ares y col., 2015) y en la miel que producen (Soto y col., 2011) reafirmando su baja toxicidad. Además, al igual que con humanos, se ha demostrado un efecto positivo en la longevidad de las abejas a las que se les administró alimento suplementando con resveratrol (Costa y col., 2010; Rascón y col., 2012), resultado que apoya la nula mortalidad observada para esta sustancia respecto al testigo jarabe. Sin embargo los resultados obtenidos en este trabajo son los primeros que evalúan la baja toxicidad de este compuesto incluso a altas dosis y la gran aceptabilidad del tratamiento por las abejas. En el caso del resveratrol se seleccionó la concentración máxima estudiada de 7 g/l, ya que es la que corresponde al consumo 100 µg por abeja al día. Esto se debe al exitoso consumo del tratamiento, tomando inclusive más micro-litros diarios que la media calculada por abeja, confirmando de nuevo su nula toxicidad.

Un estudio realizado con aceite esencial de orégano (Albo y col., 2010), del que forma parte el **carvacrol**, sugiere que altas dosis de esta sustancia resultan tóxicas para las abejas. En cambio, en el ensayo de toxicidad aquí presentado la dosis administrada fue bastante alta (mayor de la aconsejada por la norma OECD) y no se observó mortalidad. Sin embargo, en el ensayo de dosis máxima consumida la mortalidad se debió al rechazo del tratamiento que se dispuso *ad libitum*, probablemente por su fuerte olor y consistencia oleaginosa, lo que provocó la muerte de las abejas por inanición. Las

características físicas del carvacrol, no permitían la homogeneización del aceite en el medio de administración (jarabe), de manera que únicamente con la concentración de 0,2 g/l, y la ayuda de un emulsionante (lecitina de soja), se consiguió homogeneizar el producto. El resto de concentraciones evaluadas presentaban un olor muy intenso, además el aceite por su densidad se separaba del medio azucarado quedando en la superficie del alimentador y al final las abejas morían por inanición. Finalmente la concentración de carvacrol a 0,2 g/l fue la elegida para ensayos posteriores de eficacia. No obstante, futuros estudios deberían dirigirse a la formulación de un jarabe compuesto de carvacrol que mejore la dosis de consumo por las abejas

El **toltrazuril** es una materia activa de diferentes medicamentos veterinarios registrados. El equipo de Rodríguez y colaboradores (2009) observaron que la administración de este tratamiento en condiciones de campo no era tóxica para las colonias de abejas y ayudaba a la disminuir la carga parasitaria de *N. ceranae*. En esta memoria se presenta el primer trabajo que analiza *in vitro* la toxicidad y dosis máxima consumida del toltrazuril en abejas mantenidas en condiciones controladas de laboratorio siguiendo las normas de la OECD nº 213. Los resultados obtenidos apoyan los expuestos por Rodríguez y colaboradores (2009), mostrando una nula toxicidad y alto grado de aceptabilidad del tratamiento a las 3 concentraciones evaluadas, ya que no mostraron un porcentaje de mortalidad distinto al de los testigos.

Martín-Hernández y colaboradores (2007), realizaron un ensayo de laboratorio para la determinación de la LD<sub>50</sub> para el consumo oral de **ácido oxálico**, observando una elevada mortalidad y daños tisulares en el aparato digestivo de la abeja. No obstante este mismo estudio afirma que las dosis administradas son mayores a las que se dan en condiciones de campo. En el trabajo descrito en esta memoria la mortalidad observada en el análisis de toxicidad oral fue baja y no mostró diferencias en el modo de administración, oral o por contacto. No obstante, de todos los productos evaluados (incluido el testigo sin tratamiento) fue el que mayor mortalidad mostró, aunque fue menor a la del testigo alimentado con el insecticida dimetoato.

El tratamiento de toxicidad por contacto en laboratorio simula la aplicación de campo donde el tratamiento se dispersa por los cuadros, cubriendo las abejas de jarabe que ellas limpian e ingieren. En este caso los resultados se asemejan a los obtenidos por otros autores tras su aplicación en campo, donde sugieren que el ácido oxálico no es tóxico y que se podrían administrar mayores concentraciones ya que la mortalidad es muy baja (Carrasco-Letelier y col., 2012; Proaño-Coello y col., 2014; Nanetti y col., 2015). Sin embargo la dosis máxima en su aplicación como tratamiento oral *ad libitum* en condiciones de laboratorio, resultó nula y la mortalidad fue elevada ya que morían por inanición. Este ensayo se repitió varias veces, en varios periodos del año obteniendo el mismo resultado. De manera que el ácido oxálico en condiciones de laboratorio es rechazado por las abejas. Como se ha comentado anteriormente, el modo de administración en condiciones de campo las obliga a limpiarse tras el goteo del tratamiento, de manera que la simulación de este proceso de manera continuada durante todo el ensayo de dosis máxima consumida podría ser una opción para futuros análisis de eficacia frente a *N. ceranae*.

Los glucosinolatos comprenden un amplio grupo de compuestos involucrados en muchos mecanismos de defensa de las plantas. Se utilizan también, en la defensa del desarrollo de numerosos microorganismos que afectan a humanos. Son productos naturales, altamente biodegradables y no

tóxicos, lo que les hace candidatos a su uso en el control integral de plagas (Vig, y col., 2009). Las brassicáceas son conocidas por su riqueza en componentes indispensables para la dieta humana y animal (Jahangir y col., 2009). Los isotiocianatos liberados por la rotura de los glucosinolatos en contacto con agua han demostrado tener efectos protectores en el desarrollo del cáncer (Zhang y Talalay, 1994; Hecht, 1995, 2000; Conaway y col., 2002).

La presencia de glucosinolatos de forma natural en el polen y néctar que consumen las abejas sugieren inocuidad de estas sustancias para las abejas (Ares y col., 2015; Truchado y col., 2010). Sin embargo los datos obtenidos en este trabajo no coinciden con los publicados en referencia a la baja toxicidad de estas sustancias, debido a que la mayoría de los estudios realizados con glucosinolatos se han hecho en mamíferos y no en insectos. Por ello las concentraciones administradas a las abejas pudieron ser demasiado altas en contra a lo que se encuentra generalmente en la naturaleza. Los glucosinolatos suministrados por el grupo CREA mostraron un consumo muy bajo, siendo únicamente la harina de *Brassica nigra* al 4% la que mayor aceptación tuvo por las abejas (15% del consumo), y mortalidad similar a la del testigo. El resto de harinas mostraron una mortalidad elevada. Además las mismas harinas mostraron resultados similares en un ensayo paralelo realizado por el grupo CREA (Bolonía) con la misma harina pero activada (mirosinasa activa, datos no mostrados). Con el fin de consensuar resultados en ambos equipos se continuó trabajando con esta harina al 4%. La formulación de este tratamiento con el alimento suplementado proporcionado por los laboratorios Calier, aumentó notablemente el consumo del tratamiento, lo que determinó su uso en posteriores análisis. Futuros ensayos con este tipo de alimento ayudarían a evaluar de manera eficaz el resto de harinas descartadas.

Sin embargo, el análisis de toxicidad llevado a cabo con los glucosinolatos suministrados por el grupo TESEA manifestó que concentraciones superiores a las encontradas en la naturaleza producen una mortalidad mayor a la obtenida para el resto de productos evaluados y testigos negativos, llegando en el caso de la glucorafanina al 50% de mortalidad en las primeras 24 horas. No obstante, llama la atención que en este caso muera solo el 50% de las abejas teniendo en cuenta que todas las abejas toman la misma cantidad de sustancia al mismo tiempo y en una única dosis. Futuros estudios deberían dirigirse a la formulación de este tipo de glucosinolatos en concentraciones más diluidas y no tóxicas que permitan su evaluación en ensayos de eficacia microsporidicida. Sin embargo, el coste y bajo rendimiento en la cantidad de producto obtenido tras su extracción complica su utilización. Por este motivo no se continuó con esta formulación hasta conseguir mejores rendimientos, y poder administrarlos en el futuro junto al alimento sin perder eficacia.

## CAPÍTULO II. B.2)

El objetivo de este ensayo fue determinar la eficacia frente a *N. ceranae* en condiciones de laboratorio de todas las sustancias y a las dosis seleccionadas anteriormente, excepto para el ácido oxálico, que no se continuó trabajando con él debido al rechazo por las abejas del tratamiento.

### MATERIAL Y MÉTODOS DEL ENSAYO DE EFICACIA FRENTE A *N. ceranae*

#### 1. TRATAMIENTOS ADMINISTRADOS

Las sustancias ensayadas se eligieron según los datos obtenidos en el apartado anterior. Igualmente todas las concentraciones de uso se seleccionaron en función de los datos de toxicidad. Los tratamientos se dispusieron *ad libitum*. El consumo y mortalidad fue evaluado diariamente.

**Tabla 5.** Sustancias evaluadas.

|                    | Grupo        | Producto aplicado  | Concentración mezcla |
|--------------------|--------------|--|----------------------|
| Tratamientos       | Toltrazuril  | Toltrazuril (CEVAZURIL®)                                     | 7 g/l (jarabe)       |
|                    |              |  | 80 mg/l (jarabe)     |
|                    |              |  | 20 mg/l (jarabe)     |
|                    | Ácido tánico | Ácido tánico (SIGMA-ALDRICH® 99%)                            | 3,5 g/l (jarabe)     |
|                    | Resveratrol  | Resveratrol (MegaResveratrol®)                               | 7 g/l (jarabe)       |
| Testigos Negativos | SIN 4%       | Harinas <i>Brassica nigra</i> (Glucosinolatos, CREA-Bolonia) | 4% (candy)           |
|                    | Jarabe       | 50% azúcar/ 50% agua   | ---                  |
|                    | Candy        | Candy Laboratorios Calier®                                   | ---                  |
| Testigo Positivo   | Fumagilina   | Fumagilina (FUMIDIL-B®)                                      | 120 mg/l (jarabe)    |

#### 2. RECOGIDA DE ABEJAS PARA EL TRABAJO EN LABORATORIO

Las colonias de abejas de las que se obtuvieron los cuadros de cría para proporcionar abejas sanas, recién nacidas y utilizadas en las infecciones experimentales, se obtuvieron según lo descrito en el capítulo II. B.1 (pág. 54).



### 3. RECOLECCIÓN DE ABEJAS: NACIMIENTO, MANEJO Y ENJAULADO

Todos estos aspectos de la metodología han sido descritos en el apartado anterior (capítulo II. B.1, pág. 54). Sin embargo, con el fin de confirmar el estado sanitario y la ausencia *N. ceranae* en las abejas recién nacidas, se realizó un análisis por PCR (Martín-Hernández y col., 2007).

### 4. OBTENCIÓN DE ESPORAS DE *N. ceranae*

La obtención de esporas frescas de *N. ceranae* para la infección experimental de las abejas, se describe en el capítulo I (pág. 35).

### 5. CONDICIONES GENERALES DEL ENSAYO

Estudios previos de nuestro equipo demostraron, que las infecciones con abejas adultas (5 días) en condiciones de laboratorio son más homogéneas (Higes y col., 2013a), por lo que fueron estas las utilizadas para los ensayos.

Cada grupo se componía de 3 jaulas (3 réplicas; 15 abejas jaula, 45 abejas en total) por sustancia y concentración, además se incluyeron los testigos correspondientes.

Al tratarse de un ensayo de eficacia frente a *N. ceranae*, se utilizó la fumagilina (Higes y col., 2008c) como testigo positivo a una dosis de 120 mg/l (Higes y col., 2010). Se incorporan además otros testigos como C+ (testigo infectado con *N. ceranae*, alimentado solo con jarabe/*candy*), y C- (testigo de abejas no infectadas para confirmar la ausencia de contaminación durante el ensayo).

Todas las sustancias analizadas se preparaban y administraban en un jarabe de agua y azúcar (50% azúcar, 50% agua). En el caso de los glucosinolatos, la harina (SIN) se mezcló con *candy* enriquecido (suministrado por los laboratorios Calier).

### 6. INFECCIÓN EXPERIMENTAL

Para la realización de la infección experimental se siguió la metodología descrita por Higes y colaboradores (2007). Las abejas se mantuvieron 2 horas sin alimento antes de la infección, de esta manera todas las abejas estaban en las mismas condiciones alimentarias, y con similar contenido en el aparato digestivo. Seguidamente, las 45 abejas de cada grupo fueron levemente anestesiadas con CO<sub>2</sub> para facilitar su manejo, y se infectaron manualmente con 100.000 esporas de *N. ceranae* (Higes y col., 2007, Martín-Hernández y col., 2011) en un volumen de 2 µl (concentración de 50.000 esporas/µl, obtenida con recuento en cámara Neubauer; OIE 2008). El testigo negativo fue tratado del mismo modo y se le administró 2 µl de agua estéril sin esporas.

### 7. ADMINISTRACIÓN DEL TRATAMIENTO Y RECOGIDA DE MUESTRAS

A los 5 días post-infección se administraron las sustancias, seleccionadas en el capítulo anterior, mezcladas en el alimento y a la dosis establecida (tabla 5). El tratamiento se mantuvo durante las 72 horas que duró el ensayo. La evaluación de la eficacia de cada tratamiento realizó en 15 abejas (5 por

cada jaula) a las 24, 48 y 72 horas post-tratamiento. Para ello se extrajeron las abejas de cada jaula separando el abdomen del resto de la abeja con ayuda de unas pinzas, este procedimiento se realizó en cada punto de muestreo. Los 15 abdómenes se introdujeron en pocillos independientes de una placa multi-pocillo que contenía 180 µl de agua estéril y bolas de vidrio (2 mm de diámetro, Sigma®) introducidas previamente. Las placas se congelaron (-20° C) hasta su análisis por PCR cuantitativa. El consumo y la mortalidad se registraron también a las 24, 48 y 72 horas.

## 8. ANÁLISIS POR BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA EFICACIA FRENTE A *N. ceranae*

**8.1. Extracción de ADN:** las placas multi-pocillo fueron agitadas durante 6 minutos para romper los abdómenes con ayuda de las bolas de vidrio introducidas en los pocillos (TissueLyser, Qiagen®). Se utilizaron 15 µl del macerado para su extracción transfiriéndolo a otra placa multi-pocillo (Eppendorf®) con 30 µL de buffer ATL, y 20 µL de proteinasa K. Esta se incubó toda la noche a 56 °C. La extracción de ADN se realizó según el protocolo *BS96 DNATissue* de Qiagen® en el aparato Biosprint® (Botías y col., 2011).

**8.2. Análisis molecular por PCR:** una vez extraído el ADN se determinó la carga parasitaria, a las 24, 48 y 72 horas post-tratamiento, mediante el análisis por PCR cuantitativa (Roche Light Cycler® 480) determinando el valor del ciclo de amplificación (*Cp*; *Crossing point = cycle threshold value*; *Ct*). Para ello se utilizaron dos parejas de cebadores (descritas en el capítulo III, tabla 11, pág. 118) que amplifican para un fragmento del gen que codifica para la proteína del túbulo polar 3 (PTP3) y para la subunidad mayor de la ARN polimerasa II (RPB1). Estos genes están descritos en la base de datos *Gen Bank* como genes de copia única y han sido objeto de estudio en trabajos previos (Gómez-Moracho y col., 2014, 2015; Maside y col., 2015) ya que las proteínas que codifican están directamente relacionadas con funciones vitales para los microsporidios, como la infección (PTP) y su actividad replicativa dentro del hospedador (RPB1). El diseño de las parejas de cebadores y la sonda utilizadas en la PCR cuantitativa se describe en el capítulo III, tabla 11, pág. 118.

## 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

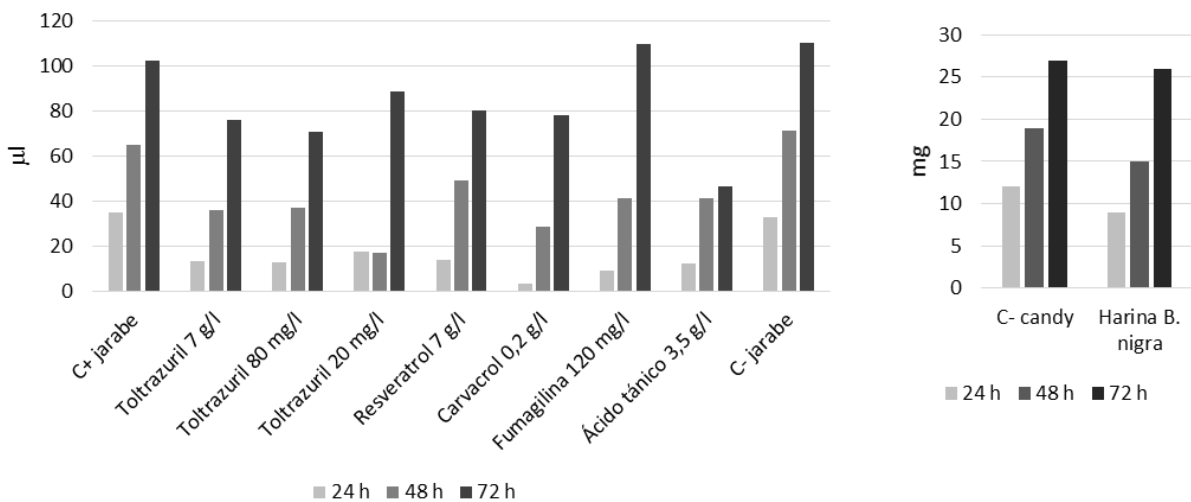
Se obtuvieron un total de 15 datos de *Cp* por grupo y por punto de muestreo. El valor de *Cp* se utilizó para determinar la eficacia de cada tratamiento ensayado. Se compararon las *Cp* medias de cada tratamiento y punto de muestreo, de forma que a mayor *Cp*, menos concentración de ADN de *N. ceranae* detectado y por tanto mayor eficacia del tratamiento y a la inversa, a menor valor de *Cp*, mayor cantidad de ADN de *N. ceranae* detectado, por tanto menos eficacia. Se realizó un análisis estadístico para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre los valores de *Cp* obtenidos en cada grupo experimental. Previamente se realizó un *test de Levene* para determinar si las varianzas de los valores obtenidos en cada grupo eran homogéneas. Posteriormente se realizó un análisis de ANOVA de una vía, seguido de un *test post hoc de Dunnett* para varianzas no homogéneas o de *Bonferroni* en caso de varianzas homogéneas, para determinar los grupos con valores *Cp* diferentes estadísticamente respecto a los testigos negativos (que recibieron exclusivamente jarabe) y sin diferencias significativas respecto al testigo positivo de tratamiento (que recibió fumagilina). Considerando diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ . Los análisis se llevaron a cabo por el software estadístico SPSS versión 21.0.

**RESULTADOS DEL ENSAYO DE EFICACIA FRENTE A *N. ceranae***

**1. RESULTADOS DEL CONSUMO Y MORTALIDAD**

Los tratamientos se dispusieron *ad libitum* durante todo el ensayo, no observándose rechazo del tratamiento en ninguno de los grupos (figura 20-A) y obteniendo resultados de consumo similares a los obtenidos en el apartado anterior (figura 17, Capítulo II.B.1), al igual que la cantidad de principio activo consumido a las 24, 48 y 72 horas (tabla 6). No se observó mortalidad durante el ensayo.

**Figura 20-A.** Consumo acumulado de tratamiento durante el ensayo de eficacia.



\*Nótese que la escala de las harinas de *B. nigra* están en miligramos. Consumo acumulado medio por abeja a lo largo de todo el ensayo.

**Tabla 6.** Mortalidad y consumo acumulado de principio activo durante el ensayo de eficacia.

|                      | Consumo acumulado de principio activo ( $\mu\text{g}$ ) |       |              | % mortalidad acumulada |
|----------------------|---|-------|--------------|------------------------|
|                      | 24 h  | 48 h  | 72 h         | 24 - 72 h              |
| C+ jarabe            | ---   | ---   | ---          | 0                      |
| Toltrazuril 7 g/l    | 93,8  | 254,1 | <b>534,1</b> | 0                      |
| Toltrazuril 80 mg/l  | 1,1   | 3,0   | <b>5,7</b>   | 0                      |
| Toltrazuril 20 mg/l  | 0,4   | 0,3   | <b>1,8</b>   | 0                      |
| Resveratrol 7 g/l    | 99,4  | 343,7 | <b>562,2</b> | 0                      |
| Carvacrol 0,2 g/l    | 0,7   | 5,8   | <b>15,7</b>  | 0                      |
| Fumagilina 120 mg/l  | 1,1   | 5,0   | <b>13,2</b>  | 0                      |
| Ácido tánico 3,5 g/l | 43,1  | 144,6 | <b>162,8</b> | 0                      |
| C- jarabe            | ---   | ---   | ---          | 0                      |

|                        | Consumo acumulado de harina ( $\mu\text{g}$ ) |      |             | % mortalidad acumulada |
|------------------------|---|------|-------------|------------------------|
|                        | 24 h  | 48 h | 72 h        | 24 - 72 h              |
| C- candy               | ---   | ---  | ---         | 0                      |
| Harina <i>B. nigra</i> | 360   | 600  | <b>1040</b> | 0                      |

\*Los datos mostrados hacen referencia al consumo medio de una abeja.

## 2. RESULTADOS DE EFICACIA

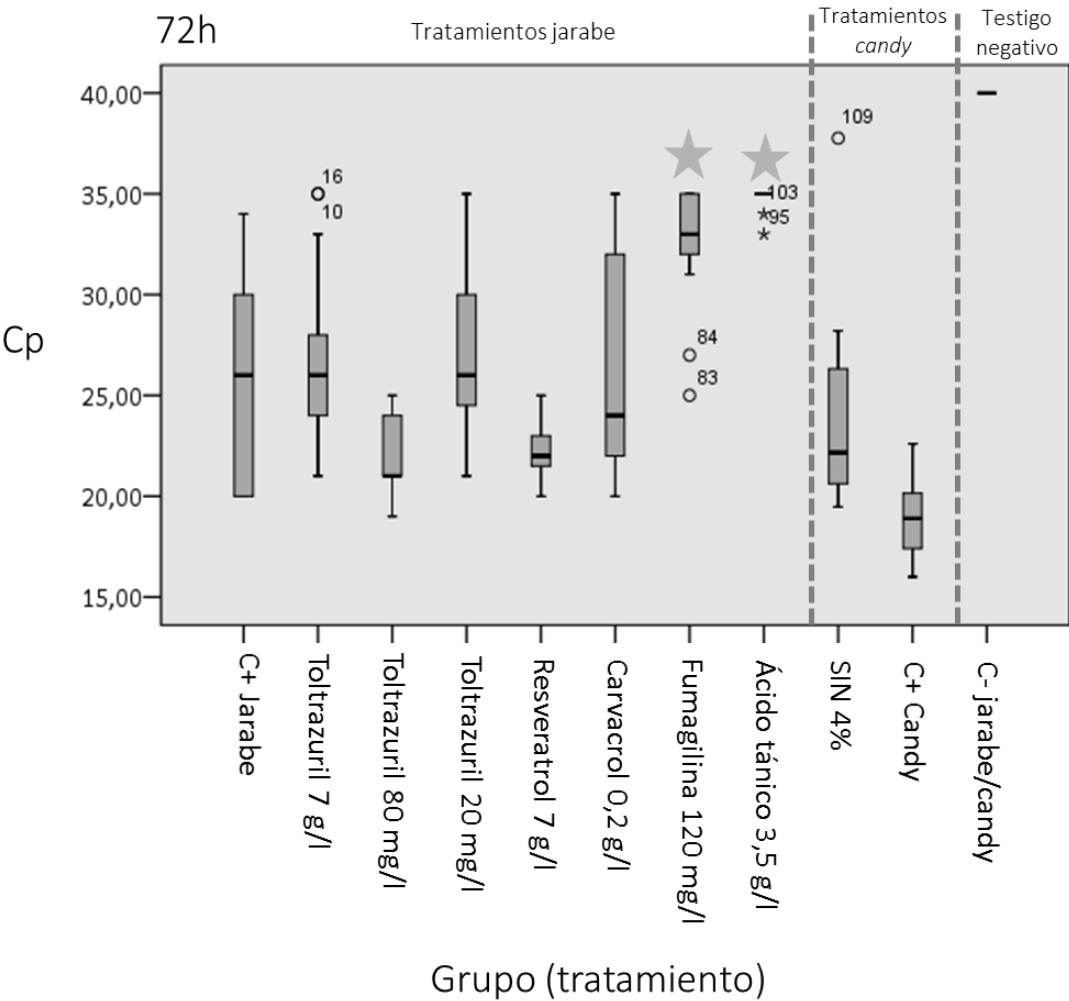
Los valores de *Cp* obtenidos para la amplificación de ambos genes (*PTP3* y *RPB1*) fueron muy similares, por lo tanto a continuación únicamente se describen los obtenidos para el gen *PTP3* de *N. ceranae*. No hubo diferencias estadísticamente significativas en los datos obtenidos a las 24 y 48 horas, de manera que solo se detallan los obtenidos a las 72 horas.

El ciclo de amplificación en el que se detectó señal en qPCR varió entre las muestras. Las abejas de los grupos que recibieron ácido tánico y fumagilina, mostraron a las 72 horas de aplicación de los tratamientos unos valores de *Cp* significativamente superiores a los observados en testigo positivo con jarabe (C+. ANOVA  $p < 0,0001$ ,  $F = 28,477$ ). Esto indica que la carga parasitaria de las abejas de estos grupos (ácido tánico y fumagilina) era significativamente inferior al del testigo (C+). En cambio no hubo diferencias en el resto de grupos respecto al testigo positivo de infección (figura 20: A).

En las abejas del grupo testigo no infectado (C-), se confirmó la ausencia de *N. ceranae*, lo que valida la metodología experimental, asegurando de esta manera que no existió contaminación cruzada durante el ensayo.

El análisis estadístico de los valores de *Cp* del grupo SIN 4 % respecto al testigo positivo alimentado con alimento semi-sólido, no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) a las 72 horas. Sin embargo, si se observó que con las harinas de *B. nigra* al 4%, el promedio de las *Cp* a las 72 horas de las abejas que recibieron tratamiento son ligeramente superiores (figura 20: B) que las testigo no tratadas (C+ alimento semi-sólido).

Figura 20. A: Representación de los valores de *Cp* a las 72 horas post-tratamiento.



\* (Estrella) Diferencias estadísticamente significativas respecto al testigo positivo jarabe. A mayor *Cp* menos ADN en la muestra, que equivale a menos carga parasitaria. *Cp* menores equivale a mayor carga parasitaria.

**B:** Valores promedio de las *Cp* de las abejas tratadas con SIN 4% en alimento semi-sólido suplementado, respecto a las abejas que recibieron el mismo alimento sin tratar.

| Valor Cp                    |          |       |
|-----------------------------|----------|-------|
| C+ 72h                      | Promedio | 18,87 |
|                             | d.s.     | 1,90  |
| Glucosinolatos + Calier 72h | Promedio | 20,84 |
|                             | d.s.     | 9,67  |



## DISCUSIÓN DEL ENSAYO DE EFICACIA FRENTE A *N. ceranae*

La nosemosis es una enfermedad que afecta tanto a las abejas a nivel individual como al conjunto de la colonia de abejas (Higes y col., 2008c). Desde la prohibición del uso de la fumagilina en España y otros países de la Unión Europea por la Agencia del Medicamento en 2008, los apicultores solo disponen de medidas profilácticas (Bailey, 1957; Pernal y col., 2010), mecanismos zootécnicos como el cambio de reina anual (Botías y col., 2012b) y una adecuada nutrición para favorecer la salud de la colonia y ayudar a reducir la susceptibilidad a las enfermedades (Basualdo y col., 2014; Antúnez y col., 2015). La administración junto al alimento de complementos nutricionales a base probióticos y de metabolitos producidos por bacterias (surfactinas, bacteriocinas) sugiere la disminución en la susceptibilidad de la abeja a la infección (Porrini y col., 2010; Vásquez y col., 2012; Forsgren y col., 2013; Maggi y col., 2013).

En el presente trabajo se evaluó una serie de sustancias que, por su actividad microbicida y fungicida, fueron elegidas para analizar su efecto frente a *N. ceranae* en condiciones de laboratorio, con la finalidad de explorar su posible uso en campo como herramientas terapéuticas. Después de los análisis previos de toxicidad y dosis máxima consumida en abejas, se determinó su eficacia en abejas infectadas experimentalmente en laboratorio por *N. ceranae*.

Como en estudios anteriores, la fumagilina resultó ser una sustancia muy eficaz disminuyendo la carga parasitaria de manera significativa (Higes y col., 2008, 2009, 2010; Williams y col., 2008b, 2010a; Giacobino y col., 2016a). En el caso del ácido tánico, los resultados obtenidos a las 72 horas post-tratamiento fueron similares a los obtenidos en abejas tratadas con fumagilina, mostrando baja carga parasitaria y significativamente menor en los grupos tratados con fumagilina y ácido tánico que en el testigo positivo (C+, abejas infectadas y no tratadas), confirmando la eficacia de estas dos sustancias. El resto de productos evaluados en jarabe (toltrazuril, resveratrol y carvacrol), no mostraron diferencias estadísticamente significativas al testigo positivo (C+).

En el caso del **ácido tánico**, Chung y colaboradores (1998) ya observaron la capacidad de los taninos inhibiendo el crecimiento de hongos filamentosos de varios géneros (*Botrytis sp*, *Penicillium sp*,...etc) y bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis*,...etc). Este es el primer trabajo que muestra la eficacia de esta sustancia frente al microsporidio *N. ceranae*.

En cuanto a la **fumagilina**, como ya se ha comentado, fue la más eficaz. Sin embargo, algunos estudios sugieren que provoca un incremento en el desarrollo de *N. ceranae* en abejas sometidas recurrentemente a bajas concentraciones de esta sustancia a lo largo del tiempo, similar a lo que ocurre con tratamientos prolongados y la permanente exposición a residuos de fumagilina en la colmena (Huang y col., 2013). Además la fumagilina interfiere con la enzima metionina amino-peptidasa (MetAP2) encargada de la modificación de proteínas para su normal funcionamiento. Esta proteína que se encuentra en todas las células eucariotas de manera que su mal funcionamiento puede resultar perjudicial para la fisiología de la abeja (Huang y col., 2013).

En el caso del **toltrazuril**, este es el primer trabajo en condiciones de laboratorio que evalúa la eficacia de este producto frente a *N. ceranae*. Curiosamente se observan resultados similares entre las concentraciones más extremas (7 g/l y 20 mg/l) y una menor eficacia en la concentración intermedia

(80 mg/l). De este modo futuros estudios deberían dirigirse al análisis de la eficacia de este producto en ensayos más largos en condiciones de laboratorio (a los recomendados por la norma OECD) que apoyen los resultados de eficacia frente a *N. ceranae* observados en condiciones de campo por Rodríguez y colaboradores (2009).

Futuros estudios deben dirigirse a la mejora en la administración del **carvacrol** a las abejas mediante un jarabe homogéneo y que no generase rechazo por las abejas a altas concentraciones, ya que ayudaría ver con más claridad la eficacia de este producto.

Los resultados de eficacia en estudios previos realizados con el **resveratrol** en este grupo (CIAPA) desarrollados en laboratorio a la misma concentración que en el trabajo aquí descrito (7 g/l; Informe proyecto RTA 2009-00105-C02), si mostraron una eficacia en la disminución del número de esporas a las 72 horas post-tratamiento. Sin embargo en este estudio no se observó una reducción en el nivel de infección. Estos resultados contradictorios probablemente se deben a las diferencias en la metodología utilizada, principalmente en el método para la evaluación de la carga parasitaria de las abejas, ya que en el ensayo previo se realizó mediante recuento de esporas por microscopía óptica y en el trabajo aquí descrito se realizó con PCR cuantitativa. Esta técnica es mucho más sensible y evalúa la cantidad de ADN de la muestra, tanto de las formas maduras del microsporidio como de las fases intermedias, lleguen estas a completar su ciclo biológico o no. Sin embargo, los resultados de eficacia en campo observados en el ensayo previo realizado por el CIAPA (Informe proyecto RTA 2009-00105-C02), los resultados del aumento en la esperanza de vida de las abejas observados tras la administración de bajas concentraciones de resveratrol (30, 130  $\mu$ M) por el grupo de Rascón y colaboradores (2012) y de 0,01 mg/g en el equipo de Costa y colaboradores (2009), fueron decisivos para no descartar el producto y continuar trabajando con él en los siguientes ensayos.

En este trabajo los **glucosinolatos**, a pesar de mostrar un consumo óptimo del tratamiento, tampoco mostraron un efecto estadísticamente significativo respecto al testigo positivo, a pesar de que si se observó cierto efecto. Estos datos sugieren que probablemente una mayor concentración o con un consumo prolongado de estas harinas, con alto contenido en glucosinolatos, pudiera disminuir la carga parasitaria de *N. ceranae* en las abejas o al menos impedir la multiplicación del microsporidio. Por tanto serían necesarios más estudios sobre la capacidad de los glucosinolatos en disminuir la carga parasitaria de *N. ceranae* en las abejas.

Para determinar la eficacia se utilizó una cuantificación relativa mediante PCR cuantitativa, utilizando los genes *RPB1* y *PTP3*, que han mostrado de forma equivalente en este trabajo ser herramientas útiles para establecer la eficacia de los tratamientos.

Es necesario seguir trabajando con el carvacrol y los glucosinolatos en condiciones de laboratorio para mejorar la administración del tratamiento y conseguir aumentar la dosis máxima de consumo. De este modo, como se explicó en el apartado de análisis de dosis máxima consumida, el consumo de una abeja es muy variable en condiciones de laboratorio, por ello, asumiendo la alta disponibilidad de alimento en condiciones de campo se decidió en el caso del ácido tánico, aumentar la dosis eficaz evaluada en el laboratorio (3,5 g/l) a 7 g/l para su evaluación en campo, de esta manera se conseguiría que con un consumo mínimo ingiriesen la dosis máxima.

En el caso del toltrazuril, a pesar de no mostrar una eficacia significativa en condiciones de laboratorio, no se descartó seguir trabajando con este producto. En cambio se decidió trabajar en

campo con la concentración de 80 mg/l por ser la más próxima a la administrada por Rodríguez y colaboradores (2009), que utilizaron 100 mg/l por colmena obteniendo resultados positivos en la disminución de la carga parasitaria.

Del mismo modo tampoco se descartó seguir trabajando con el resveratrol ya que, como hemos comentado anteriormente, en ensayos previos realizados en el CIAPA resultó ser eficaz frente a *N. ceranae* (Informe proyecto RTA 2009-00105-C02) y se vio aumentada la esperanza de vida de las abejas (Costa y col., 2009; Rascón y col., 2012). Sin embargo la eficacia de las bajas concentraciones de resveratrol utilizadas por los equipos de Rascón (30, 130  $\mu$ M) y Costa (0,01 mg/g), además de la gran cantidad de residuo que deja en las colmenas observado por el grupo del CIAPA, fue decisivo para disminuir a la mitad la concentración empleada en este trabajo (de 7 g/l a 3,5 g/l) para su evaluación en condiciones de campo.

En resumen el ácido tánico, toltrazuril y resveratrol fueron los tratamientos seleccionados para evaluar su eficacia en el siguiente ensayo de campo.



## CAPÍTULO II. C)

### Ensayo de campo: eficacia de diferentes sustancias frente a *N. ceranae* y su efecto en la colonia de abejas.

Para extrapolar los datos obtenidos en el laboratorio a las condiciones naturales de la colonia hay que tener en cuenta que las abejas no son individuos independientes, sino que viven en estrecha colaboración en la colonia, compuesta por gran número de individuos. Las abejas adquieren desde el inicio un comportamiento social y su desarrollo a nivel individual está directamente relacionado con la demanda de trabajo en la colmena. Las castas que forman las colonias de abejas tienen diferentes funciones que a su vez varían dependiendo de la edad de la abeja. Todo este equilibrio biológico hace que sea necesario considerar a la colonia como un súper organismo.

Conociendo que *N. ceranae* produce la muerte de una colonia en un tiempo variable (Higes y col., 2008c; Botías y col., 2011), en este capítulo se evalúa si las sustancias seleccionadas previamente en base a los resultados obtenidos en condiciones de laboratorio, presentan una eficacia frente a *N. ceranae* cuando son aplicadas en condiciones de campo y sobre el súper organismo que es la colonia de abejas. De manera que el objetivo principal de este capítulo es evaluar la eficacia de las sustancias evaluadas anteriormente en el laboratorio para reducir la carga parasitaria de *N. ceranae* en condiciones de campo, ayudando a controlar el desarrollo de este microsporidio y mejorando el estado sanitario de la colonia.

## MATERIAL Y MÉTODOS DEL ENSAYO DE CAMPO

### 1. LOS TRATAMIENTOS

El ácido tánico (TA, Sigma-Aldrich®), el toltrazuril (TO, Cevazuril®, CEVA) y el resveratrol (RE, MegaResveratrol®) fueron las sustancias seleccionadas, cuya concentración se calculó en base a los resultados obtenidos en el capítulo II B.2. Como se ha comentado en la discusión del apartado anterior, en el caso del resveratrol se decidió disminuir la concentración utilizada de laboratorio a la mitad (de 7 g/l a 3,5g/l). Esta modificación es consecuencia de los resultados obtenidos en ensayos de campo anteriores (Informe proyecto RTA 2009-00105-C02; Costa y col., 2009; Rascón y col., 2012) donde se obtuvieron resultados positivos de eficacia. De forma que se pretendía ajustar la concentración utilizada mediante este segundo ensayo. Sin embargo la baja eficacia observada en un primer momento (descrito en resultados), nos llevó a modificar de nuevo su concentración elevándola a 5 g/l de forma excepcional. Para el resto de tratamientos (ácido tánico y toltrazuril) se utilizaron las dosis descritas en la tabla 7. Como testigo positivo de la eficacia del tratamiento se comparó, de igual manera que en el ensayo de laboratorio, con la fumagilina (Higes y col., 2011). Varios grupos de colonias que no fueron tratadas durante todo el ensayo sirvieron como testigos negativos.

Para todos los productos ensayados se estudió además la forma de aplicación, suministrándoles el tratamiento en alimento líquido o jarabe (1:1, azúcar y agua), comúnmente utilizado en época de mayor actividad de las colonias (primavera) y alimento semi-sólido o denominado comúnmente por los apicultores *candy* (50% fructosa, 50% glucosa y 30% agua), administrado en temporada de baja actividad (otoño; Botías y col., 2013b). La duración del tratamiento fue de 4 semanas en todos los casos. El tratamiento aplicado consistía en un total de 1000 ml de jarabe dividido en 4 dosis de 250 ml que se administraban semanalmente. En el caso del alimento semi-sólido se componía de 1 Kg de este tratamiento que se introducía en la colmena de una sola vez. Todos ellos fueron administrados en bolsas de plástico alimentario colocadas sobre la cámara de cría y su consumo fue evaluado semanalmente. El alimento que no consumían en el tiempo establecido se retiraba de la colonia y se pesaba. Los grupos y concentraciones administradas se describen en la tabla 7.

Tabla 7. Grupos de colonias del estudio, productos y posología utilizada en cada aplicación. \* Aumento de la concentración del resveratrol de otoño a primavera debido a los resultados obtenidos en otoño.

62 Colonias evaluadas

| Tratamiento        | Grupo               | Nº Colonias | Producto aplicado                | Posología                            |               |              | Momento aplicación      |
|--------------------|---------------------|-------------|----------------------------------|--------------------------------------|---------------|--------------|-------------------------|
|                    |                     |             |                                  | Concentración mezcla                 | Volumen total | Dosis        |                         |
| Nuevas sustancias  | Toltrazuril jarabe  | 6           | Toltrazuril (CEVAZURIL®)         | 80 mg/l                              | 1 l/colonia   | 250 ml       | Otoño 13 / Primavera 14 |
|                    | Toltrazuril candy   | 6           | Toltrazuril (CEVAZURIL®)         | 80 mg/l                              | 1 Kg/colonia  | 1 Kg/colonia | Otoño 13 / Primavera 14 |
|                    | Ácido tánico jarabe | 6           | Ácido tánico (SIGMA-ALDRICH 99%) | 7 g/l                                | 1 l/colonia   | 250 ml       | Otoño 13 / Primavera 14 |
|                    | Ácido tánico candy  | 6           | Ácido tánico (SIGMA-ALDRICH 99%) | 7 g/l                                | 1 Kg/colonia  | 1 Kg/colonia | Otoño 13 / Primavera 14 |
|                    | Resveratrol jarabe  | 6           | Resveratrol (MegaResveratrol®)   | 3,5 g/l Otoño<br>5 g/l Primavera     | 1 l/colonia   | 250 ml       | Otoño 13 / Primavera 14 |
|                    | Resveratrol candy   | 6           | Resveratrol (MegaResveratrol®)   | 3,5 g/l Otoño<br>5 g/l Primavera     | 1 Kg/colonia  | 1 Kg/colonia | Otoño 13 / Primavera 14 |
| Testigo Positivo   | Fumagilina          | 6           | Fumagilina (FUMIDIL-B®)          | 120 mg/l jarabe                      | 1 l/colonia   | 250 ml       | Otoño 13 / Primavera 14 |
| Testigos Negativos | Jarabe              | 6           | ---                              | solo jarabe                          | 1 l/colonia   | 250 ml       | Otoño 13 / Primavera 14 |
|                    | Candy               | 6           | ---                              | solo candy<br>(alimento semi-sólido) | 1 Kg/colonia  | 1 Kg/colonia | Otoño 13 / Primavera 14 |
|                    | Sin alimento        | 8           | ---                              | ---                                  | ---           | ---          | ---                     |



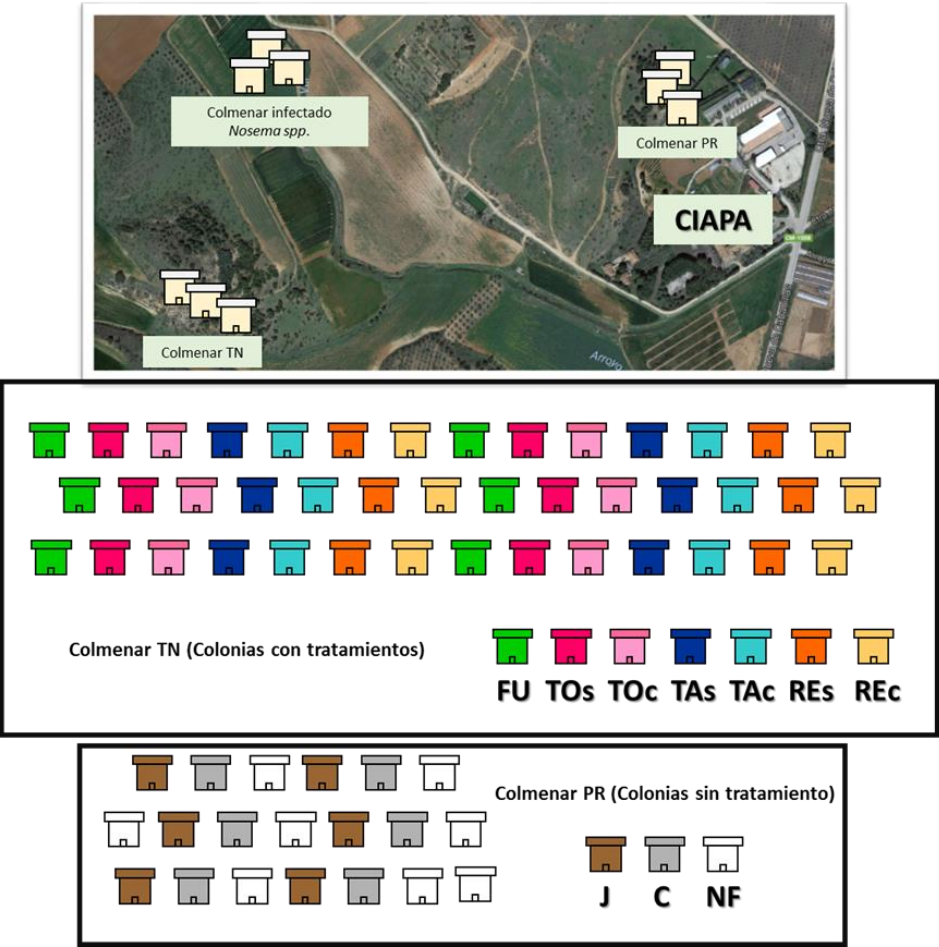
## 2. COLONIAS DE ABEJA MELÍFERA

Este ensayo se realizó siguiendo la metodología descrita previamente por Botías y colaboradores (2013a). Se utilizaron 62 colonias de abejas (*A. mellifera iberiensis*) que se adquirieron como núcleos (5 cuadros, con reina nueva, cría, abejas obreras y reservas de miel) al mismo apicultor en la primavera del 2013. Las 62 colonias utilizadas para este ensayo se seleccionaron por presentar una población de abejas adultas y cría similar. Las colonias se dispusieron en los colmenares experimentales del CIAPA y se realizó un seguimiento durante una temporada apícola, de otoño 2013 a otoño 2014. Durante los primeros meses (agosto y septiembre de 2013) tuvieron un periodo de adaptación a las condiciones de campo de la zona. Los colmenares utilizados estaban situados próximos a otro colmenar experimental poblados con colonias de abejas naturalmente infectadas con *N. ceranae*, el cual actuó como fuente natural de infección para las colonias de abejas que fueron utilizadas en el ensayo (figura 21). Una vez infectadas las colonias del estudio, el colmenar que actuaba de fuente natural de infección fue tratado con fumagilina, para evitar reinfecciones.

Para confirmar si se había producido una parasitación natural por *N. ceranae*, se recogieron abejas pecoreadoras ( $n > 30$ ) de cada una de las colmenas al inicio del ensayo, y se analizaron mediante la técnica de PCR descrita por Martín-Hernández y colaboradores, (2012). Una vez confirmada la parasitación por *N. ceranae* en las 62 colonias, éstas fueron aleatoriamente repartidas en dos colmenares situados a 500 metros uno del otro con similar altitud y condiciones: I) Colmenar *Tío Natalio* (TN): 722 metros, 40°40'45.14"N, 3°13'1.45"W; II) Colmenar *Prácticas* (PR): 720 metros, 40°40'54.99"N, 3°12'35.77"W) como se describe en Botías y colaboradores (2013a). En el colmenar TN se ubicaron las colonias de abejas que recibirían las sustancias a evaluar seleccionadas: ácido tánico en jarabe (TAs), ácido tánico en candy (TAc), toltrazuril en jarabe (TOs), toltrazuril en candy (TOc), resveratrol en jarabe (REs), resveratrol en candy (REc), fumagilina (FU, testigo positivo), mientras que en el colmenar PR se establecieron los 3 grupos testigos negativos o sin tratamiento: jarabe (S), alimento semi-sólido ó *candy* (C) y colonias no alimentadas (NF). En el caso de los grupos S y C únicamente recibieron el alimento sin tratamiento. En total se trabajó con 10 grupos experimentales de 6 colonias cada una excepto el grupo sin alimentar (NF) que estaba formado por 8 colonias (figura 21).

Al comienzo del ensayo (octubre 2013), ninguna de las colonias mostró signos de enfermedad en las abejas adultas o en la cría. Siguiendo las recomendaciones del RD608/2006 y con la finalidad de evitar efectos negativos del ácaro *V. destructor* en las colonias de abejas, se realizaron los pertinentes tratamientos acaricidas mediante el uso de flumetrina (Bayvarol®) y cumafós (Check-Mite+®) en otoño de 2013 y primavera de 2014 respectivamente.

**Figura 21.** Representación gráfica de la disposición de los colmenares y grupos de colonias dentro de cada colmenar.



### 3. CRONOLOGÍA DEL ENSAYO DE CAMPO

La cronología del ensayo se muestra en la tabla 8. El seguimiento del estado sanitario de la colonia y la recogida de muestras para análisis de patógenos se realizaron en cuatro momentos durante todo el estudio, coincidiendo con el inicio y final del tratamiento de otoño y de primavera. Se denominaron: pre-tratamiento-otoño (T1), post-tratamiento-otoño (T2), pre-tratamiento-primavera (T3) y post-tratamiento-primavera (T4). Los periodos entre T1 y T2 corresponden a un mes de duración (4 semanas), lo mismo ocurre entre T3 y T4. En estos periodos se realizaron diferentes acciones cuyo fin era la recogida de datos que aportasen información de la carga parasitaria de *N. ceranae* y del estado de la colonia, como son: la recogida de abejas pecoreadoras y de interior, administración del tratamiento, medida de la cría y abejas adultas de la colonia, tratamiento obligatorio contra *V. destructor* y determinación de la mortalidad.

**Tabla 8. Cronología de las intervenciones realizadas en las colonias (T = todas las colonias, Cj = colonias con jarabe, Cc = colonias con candy, Sem=semana).**

| Intervenciones en las colonias   | sep-13 | oct-13   |      |      |      | nov-13<br>T2 | dic-13 /<br>feb-14 | mar-14   |      |      |      | abr-14<br>T4 | may-14 /<br>ago-14 | sep-14 |
|----------------------------------|--------|----------|------|------|------|--------------|--------------------|----------|------|------|------|--------------|--------------------|--------|
|                                  |        | sem1, T1 | sem2 | sem3 | sem4 |              |                    | sem1, T3 | sem2 | sem3 | sem4 |              |                    |        |
| Aplicación tratamiento Jarabe    |        | Cj       | Cj   | Cj   | Cj   |              |                    | Cj       | Cj   | Cj   | Cj   |              |                    |        |
| Aplicación tratamiento candy     |        | Cc       |      |      |      |              |                    | Cc       |      |      |      |              |                    |        |
| Tratamiento <i>V. destructor</i> |        | T        |      |      |      |              |                    | T        |      |      |      |              |                    |        |
| Recogida Abejas pecoreadoras     | T      | T        |      |      |      | T            |                    | T        |      |      |      | T            |                    |        |
| Recogida Abejas Interior         |        | T        |      |      |      | T            |                    | T        |      |      |      | T            |                    |        |
| Medida Nº de cría                |        | T        |      |      |      |              |                    | T        |      |      |      |              |                    |        |
| Medida Nº de abeja adulta        |        |          |      |      |      |              |                    |          |      |      |      | T            |                    |        |
| Medida producción de miel        |        |          |      |      |      |              |                    |          |      |      |      |              |                    | T      |

#### 4. SEGUIMIENTO DE LA INFECCIÓN POR PATÓGENOS EN COLONIAS EXPERIMENTALES

En los puntos de muestreo descritos en el apartado anterior se estudió la presencia de patógenos causantes de nosemosis (*N. ceranae* y *N. apis*) y los porcentajes de parasitación. Además se evaluó en los mismos puntos la ausencia o presencia de otros patógenos de las abejas muy prevalentes en nuestro país (Cepero y col., 2015) como tripanosomátidos, neogregarinos, virus de las realeras negras (BQCV) y virus de las alas deformadas (DWV).

##### Tipos de muestras:

Por cada punto de muestreo y colmena se tomaron muestras de abejas pecoreadoras y de interior que se recogieron por separado (tabla 9). Una muestra de abejas pecoreadoras está compuesta de aproximadamente 120 abejas (Antúnez y col., 2012; Cepero y col., 2014) recogidas de la entrada de la piquera, según describen Meana y colaboradores, (2010). Estas abejas se utilizaron para la detección de *N. ceranae* y *N. apis* mediante la PCR descrita por Martín-Hernández y colaboradores, (2012). Para la detección de tripanosomátidos y neogregarinos se utilizó la PCR descrita por Meeus y colaboradores, (2010). Y en algunas de ellas se determinó por secuenciación a que especie de tripanosomátido correspondía (*Crithidia mellificae* o *Lotmaria Passim*). Por último se analizó la presencia del virus de las realeras negras (BQCV) y virus de las alas deformadas (DWV) mediante la PCR descrita por Chantawannakul y colaboradores, (2006).

Un mínimo de 25 abejas de interior se tomaron del interior de la colmena, mediante barrido de los cuadros exteriores de la cámara de cría, para evitar arrastrar a la abeja reina en el muestreo. Estas abejas se utilizaron exclusivamente para determinar la carga parasitaria de la colonia (*N. ceranae* y *N.*

*apis*) mediante la determinación del número de abejas infectadas (porcentaje de parasitación; Martín-Hernández y col., 2012).

Todas las muestras de abejas una vez recogidas se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

**Tabla 9.** Composición de las muestras.

| <b>Tipo de muestra/ Análisis</b> | <b>Número de abejas</b> | <b><i>Nosema sp.</i></b> | <b>Virus</b> | <b>Tripanosomátidos y Neogregarinos</b> |
|----------------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------|---|
| Abejas pecoreadoras              | 120                     | ✓                        | ✓            | ✓                                       |
| Abejas de interior               | 25                      | ✓                        | ---          | ---                                     |

#### 4.1. Procesado de abejas pecoreadoras:

Para la extracción de los ácidos nucleicos se siguió la técnica descrita por Antúnez y colaboradores, (2012). Brevemente, 120 abejas de interior se introdujeron en una bolsa con filtro (Seward, BA6040), y se añadieron 18 ml de una solución al 50% de tampón AL (Qiagen®) adicionado con 1 µg RNA carrier/ml (Qiagen®). La muestra se maceró durante 120 segundos a baja velocidad (Stomacher 80-Microbiomaster®). A continuación se añadieron otros 9 ml de la misma solución y se procesó durante 60 segundos adicionales. El macerado se centrifugó durante 10 minutos a 1811 x *g*. El sedimento obtenido se re-suspendió en 3 ml de agua MilliQ®. El sobrenadante fue utilizado para la extracción de ARN. Se incluyeron muestras únicamente con los tampones que se procesaron en paralelo para confirmar la ausencia de contaminación durante el procesamiento.

##### 4.1.1. Extracción de ADN

Tras el macerado de las muestras se centrifugaron y se tomó una alícuota de 180 µl del sedimento re-suspendido anteriormente, que se introdujo en una placa de 96 pocillos (Qiagen®) que contenía perlas de vidrio (2 mm diámetro, Sigma®) que facilitan la rotura de la pared de la espora del microsporidio. Las placas se agitaron durante 6 minutos en un agitador de placas (TissueLyser, Qiagen®). Más tarde, 150 µl de cada muestra se transfirieron a una nueva placa multi-pocillo (Deepwell-96 plate, Eppendorf®) y se añadieron 30 µl de una solución tamponada (buffer ATL, Qiagen®) y 20 µl de Proteinasa K (Qiagen®) a la concentración marcada por el fabricante. Todo ello se incubó durante toda la noche a 56°C. El ADN fue extraído con el protocolo BS96 *DNATissue extraction* en el *BioSprint workstation* (Qiagen®). Las placas con la extracción de ácidos nucleicos fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

##### 4.1.2. Extracción de ARN y síntesis de ADN copia (ADNc)

Siguiendo el método descrito por Antúnez y colaboradores, (2012) se tomaron 400 µl de sobrenadante que se incubaron junto a 20 µl de Proteasa (Qiagen®) a 70°C durante 15 minutos en una placa multi-pocillo. La obtención del ARN se realizó según el protocolo BS96 *DNATissue extraction* en el *BioSprint workstation* (Qiagen®), seguido de una digestión con *DNase-I* (Qiagen®) para eliminar el ADN genómico. Todo el ARN obtenido se usó para generar ADN copia (ADNc) mediante una retro-

transcripción usando el kit *Quantitec Reverse Transcription Kit* (Qiagen®), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En este paso también se incluyeron muestras únicamente con los tampones utilizados para la retrotranscripción que se procesaron en paralelo para confirmar que no hay ninguna contaminación durante el procesado.

#### 4.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La detección de *Nosema spp.* se llevó a cabo según la metodología previamente descrita por Martín-Hernández y colaboradores, (2012). Para el análisis de tripanosomátidos y neogregarinos se utilizó la técnica descrita por Meus y colaboradores, (2010). En el caso de muestras positivas a tripanosomátidos, se procedió a determinar la especie (*Crithidia mellificae* o *Lotmaria passim*), mediante la técnica descrita por Da Silva y colaboradores (2004), y confirmación mediante la posterior secuenciación de los productos de PCR. Tras la secuenciación, los productos de PCR fueron purificados (*QIAquick PCR Purification Kit*, Qiagen®) y secuenciados (servicio de secuenciación de la Universidad de Alcalá, con el secuenciador ABI3730XL Applied Biosystems). Posteriormente las secuencias obtenidas fueron comparadas mediante BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) con las secuencias disponibles en la base de datos *GenBank* (NCBI).

Las PCRs convencionales fueron analizadas por electroforesis a través del sistema *QIAxcel DNA High Resolution Kit* (Qiagen®, No. 929002). Para el análisis de los virus se utilizó el protocolo de PCR cuantitativa de realeras negras (BQCV) y del virus de las alas deformadas (DWV, Chantawannakul y col., 2006).

#### 4.2. Procesado de abejas de interior:

Las abejas de interior se procesaron individualmente, macerando cada abdomen por separado como describen Martín-Hernández y colaboradores (2012). Los abdómenes de las abejas (n = 25, por colonia y punto de muestreo) se introdujeron individualmente en una placa multi-pocillo que contenía perlas de vidrio (2 mm diámetro, Sigma®) y 200 µl de agua (MiliQ). Las placas se agitaron durante 6 minutos en un agitador de placas (*TissueLyser*, Qiagen®).

##### 4.2.1. Extracción de ADN y PCR

De cada macerado se transfirieron 50 µl a una nueva placa multipocillo (Deepwell-96 plate, Eppendorf) a la que se le había añadido 50 µl de una solución Tris-HCl (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) y 15 µl de proteinasa K (Qiagen®). Las placas se incubaron 20 minutos a 95°C. El sobrenadante se usó para el análisis de ADN por PCR mediante la técnica descrita por Martín-Hernández y colaboradores, (2012). La presencia de producto amplificado tras la PCR se analizó por electroforesis utilizando el sistema *QIAxcel DNA High Resolution Kit* (Qiagen®).

##### 4.2.2. Cálculo de los porcentajes de parasitación y de conversión

El porcentaje de parasitación de cada colonia se calculó a partir del número de abejas infectadas en una muestra de abejas de interior (n=25).



El porcentaje de conversión de la parasitación, de cada colonia, en los puntos de muestreo T2, T3 y T4 se calculó respecto al valor obtenido en T1, determinando así la variación en la parasitación respecto al momento inicial del ensayo.

#### 5. MORTALIDAD DE LAS COLONIAS

La mortalidad de las colonias en los diferentes grupos experimentales se evaluó a lo largo del tiempo, anotando todas aquellas que se quedaban sin reina (aumento de zánganos), o las que finalmente morían mostrando signos de despoblamiento.

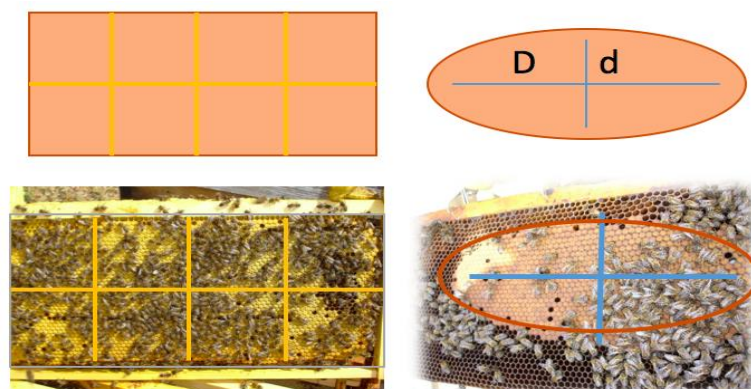
#### 6. VIGOR DE LA COLONIA

El vigor de las 62 colmenas se determinó estableciendo la superficie del cuadro ocupado con cría y el número de abejas adultas.

El área de cría se midió en otoño (T2) y primavera (T4) anotando la superficie de cría en cada cara de todos los cuadros de cada colmena de estudio. Para determinar el número de celdillas de cría, se utilizó la fórmula de una elipse estándar, estimando 4,12 celdillas por centímetro cuadrado (cm<sup>2</sup>). El total de celdillas de cría (TCC) fue calculado de la siguiente manera:  $TCC = (D \times d \times 0,785 \times 4,12)$ , donde D y d, son los dos diámetros de la elipse en cada cara del cuadro de cría (figura 22, como describió previamente Higes y colaboradores, (1999).

En T4, al final del ensayo, se determinó la población de abeja adulta (método Liebefeld: Gerig, 1983; Imdorf, 1987). Para ello, cada cara de cuadro de cría se dividió en una cuadrícula imaginaria, subdividida en 8 cuadros pequeños de igual tamaño (figura 22). El número de cuadros pequeños cubiertos por abejas de cada cara superficie se anotó para posteriormente aplicar el factor de conversión (cada cara del cuadro en nuestras colmenas (Langstroth) es de 8 dm<sup>2</sup>, y el número de abejas que pueden ocupar esa cara del cuadro es de 1100, y el factor de conversión es igual a 137,5).

**Figura 22.** Representación gráfica de la medida de la superficie de cría (elipse) y del número de abejas (rectángulo).



## 7. PRODUCCIÓN DE MIEL

La producción de miel de cada colonia se evaluó en agosto de 2014, según el método descrito por Botías y colaboradores, (2013a). Se pesó individualmente cada cuadro de miel antes y después de la extracción, calculando la cantidad total de miel obtenida por colmena y grupo de tratamiento.

## 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un estudio estadístico de los datos obtenidos. Las variables independientes analizadas fueron: el porcentaje de parasitación, el número de abejas adultas de la colonia, la superficie de cría y producción de miel. Estos parámetros se normalizaron con una transformación lineal (*Box cox* o *arcosen*). Las variables fueron comparadas a través de un análisis de varianza de una sola vía (*one-way ANOVA*) y un test de análisis no paramétrico *Kruskal-Wallis* para la producción de miel. El análisis ANOVA fue seguido de varios test *post hoc Tukey's-b* y *Dunnett*, dependiendo de la homogeneidad de la varianza (test de *Levene*). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p \leq 0,05$ . Todos los análisis se llevaron a cabo usando el programa informático *SPSS statistical software version 21.0*.

**RESULTADOS DEL ENSAYO DE CAMPO****1. NIVELES DE INFECCIÓN DE *N. ceranae* POR TRATAMIENTO**

El análisis de las abejas pecoreadoras realizado al inicio del ensayo mostró que todas las colmenas estaban parasitadas por *N. ceranae*. La detección de este patógeno se mantuvo a lo largo del estudio en todas las colonias.

Además, en los grupos FU, TOs, y el testigo C hubo una co-infección con *N. apis* en algunas de las colonias (16,6% de colonias infectadas en cada grupo) al inicio del ensayo (T1). Sin embargo, este microsporidio no se encontró en ningún otro momento del ensayo.

**1.1. Consumo del tratamiento**

Los consumos de los tratamientos administrados fueron en general muy homogéneos como se describe en la tabla 10. Todos los productos administrados fueron consumidos totalmente (tanto en otoño como en primavera) excepto en el grupo que recibió fumagilina (FU 88%), y los grupos tratados con ácido tánico tanto en jarabe como en *candy*, cuyo consumo fue muy reducido durante el otoño (42,7% y 63,7% respectivamente).

**Tabla 10.** Consumo del tratamiento en los grupos estudiados.

| Tratamiento | Consumo otoño | Consumo primavera |
|-------------|---------------|-------------------|
| TOs         | 100%          | 100%              |
| TOc         | 100%          | 100%              |
| TAs         | 42,70%        | 88,45%            |
| TAc         | 63,77%        | 95,50%            |
| REs         | 100%          | 100%              |
| REc         | 100%          | 100%              |
| FU          | 88%           | 100%              |
| J           | 100%          | 100%              |
| C           | 100%          | 100%              |
| NF          | ---           | ---               |

## 1.2. Colonias testigo negativo

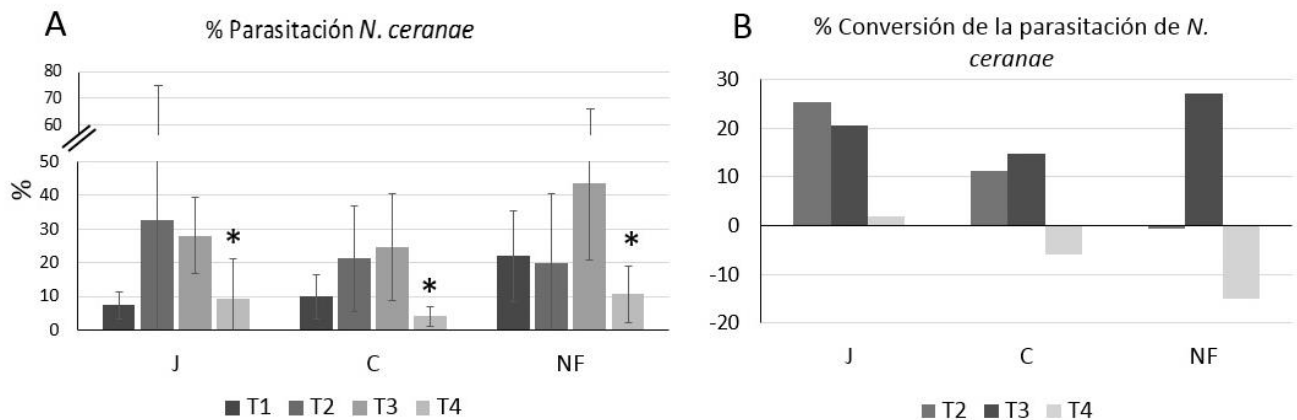
Los tres grupos testigos (C, S y NF) mostraron un comportamiento similar a lo largo del estudio. En general los tres grupos presentaron un aumento en el número de abejas infectadas por *N. ceranae* entre T1 y T2 (figura 23A), excepto el grupo que no recibió alimento (NF) que mantuvo su porcentaje de parasitación durante el otoño (T2).

En el período comprendido entre T2 y T3 hubo escasas variaciones en los grupos J y C, que se comportaron de forma similar, En cambio en el grupo NF hubo un importante aumento en el porcentaje de parasitación.

Por último en el período de T3 a T4, todos los grupos mostraron una reducción significativa en el porcentaje de parasitación como consecuencia del efecto de dilución natural, debido al aumento del número de abejas en época de pecoreo ( $p < 0,05$  en T1, T2 y T3 respecto a T4).

Estas modificaciones en el porcentaje de infección se reflejaron en el porcentaje de conversión de la parasitación (figura 23B), en la que se observa un incremento en T2, T3 y una disminución en T4 en todos los grupos.

**Figura 23.** Porcentaje de parasitación y conversión (respecto a T1) en las colonias testigo negativo.

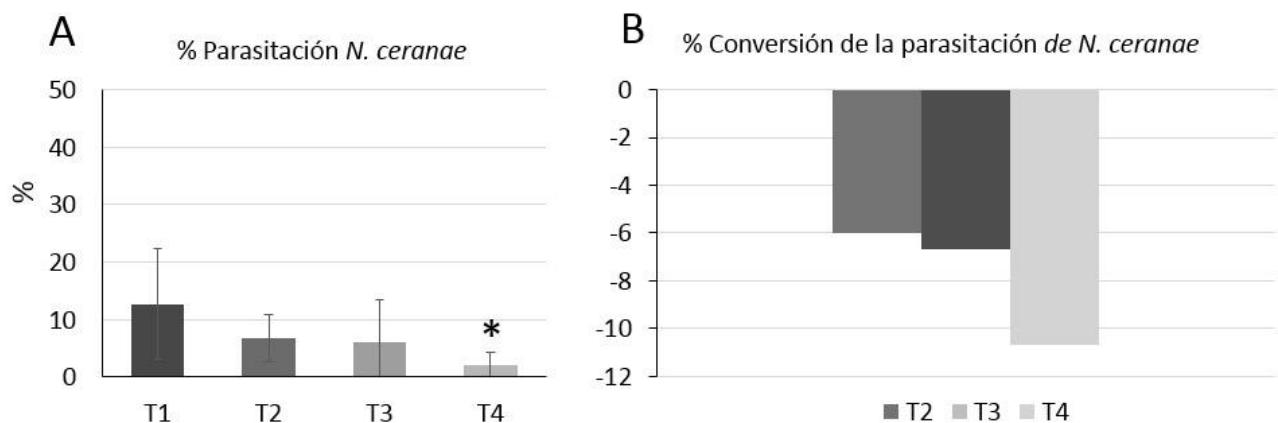


### 1.3. Colonias testigo positivo (fumagilina)

El grupo testigo tratado con fumagilina, mostró una reducción de la carga parasitaria a lo largo del estudio. Las reducciones se observan entre T1 y T2, y entre T3 y T4, siendo solo en este último periodo donde se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ; figura 24A). En T2 - T3 se observó como el nivel de abejas infectadas se mantiene en ambos puntos de muestreo ( $p > 0,05$ ).

El porcentaje de conversión de la parasitación (figura 24B), mostró una importante reducción del número de abejas infectadas con respecto al inicio del ensayo tal y como se esperaba para este tratamiento.

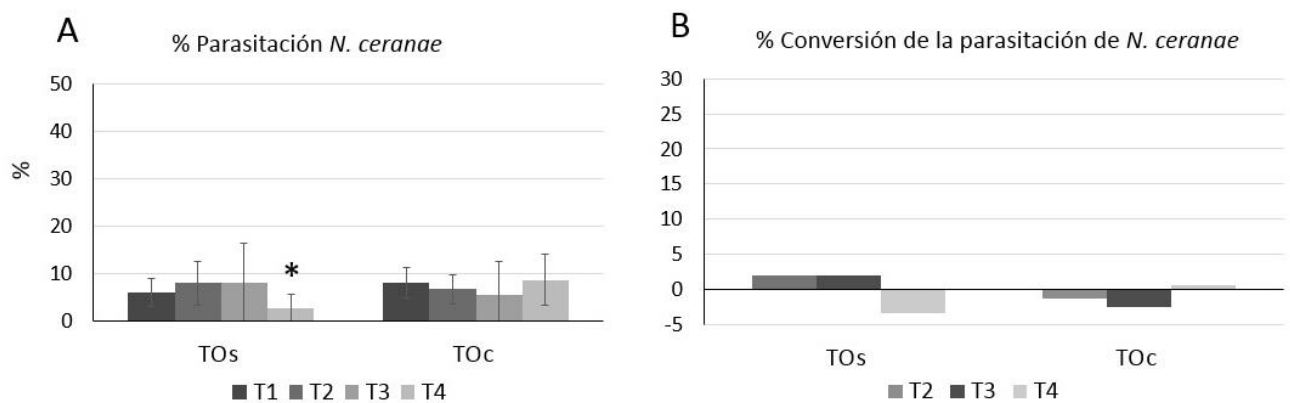
**Figura 24.** Porcentaje de parasitación y conversión (respecto a T1) en las colonias tratadas con fumagilina.



#### 1.4. Colonias tratadas con toltrazuril

Los resultados del grupo TOs (toltrazuril en jarabe) fueron similares a los de un testigo sin tratamiento. El porcentaje de parasitación aumentó de T1 a T2, se mantuvo entre T2 y T3, y finalmente se redujo en T4 debido al aumento del número de abejas en este periodo ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, únicamente es en T4 donde se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas respecto a T1, T2 y T3, debido a la dinámica natural de la colonia. En el caso contrario, TOc no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los 4 puntos de muestreo, observándose incluso un aumento de la parasitación en T4 ( $p > 0,05$ ). Los resultados obtenidos en el porcentaje de conversión de la parasitación muestran una dudosa eficacia del toltrazuril (figura 25A y B).

**Figura 25.** Porcentaje de parasitación y conversión (respecto a T1) en las colonias tratadas con toltrazuril.



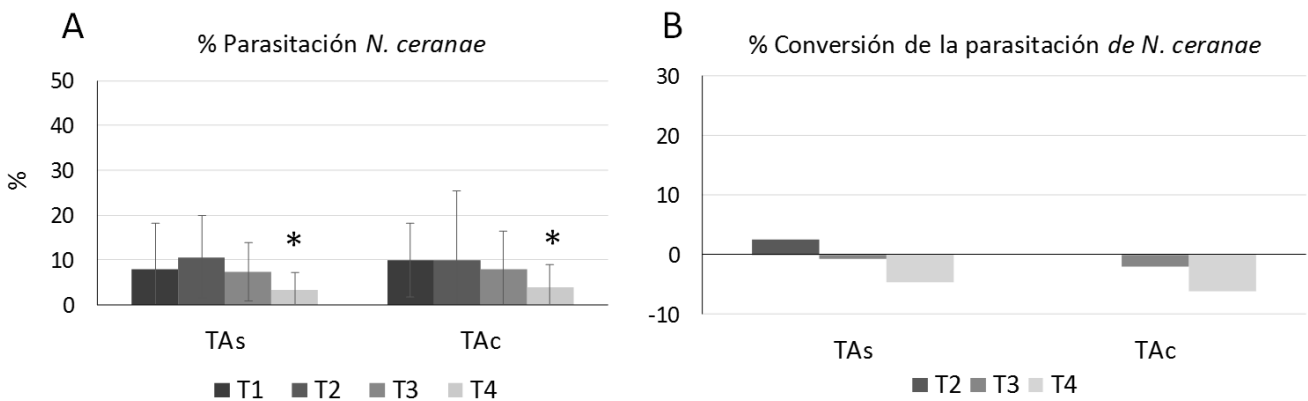
1.5. Colonias tratadas con ácido tánico

Las colonias tratadas con ácido tánico mostraron resultados similares entre sí independientemente de si el alimento se administró en jarabe o *candy*. Sin embargo hay que tener presente que el consumo fue alrededor del 50% en otoño ambos casos no llegando al 100% en primavera (tabla 10).

Cuando el ácido tánico se aplicó en jarabe se observó un aumento del porcentaje de parasitación entre T1 y T2 aunque no es estadísticamente significativo ( $p > 0,05$ ). No obstante a partir de T3 se observa una ligera reducción en la carga parasitaria de *N. ceranae* durante el estudio (figura 26A y B), que como en el resto de los grupos fue estadísticamente significativo solo en T4 respecto al resto de puntos de muestreo (T4:  $p < 0,05$ ).

En el caso del tratamiento en *candy* se observó una dinámica similar a la descrita con el tratamiento con jarabe, con la única diferencia de que entre T1 y T2 no se observa un aumento en el porcentaje de parasitación (figura 26A y B). El mantenimiento de la carga parasitaria en este punto (TAc-T2) podría deberse a que el consumo del tratamiento fue ligeramente mayor que en el alimento en jarabe (tabla 10). Del mismo modo solo se obtuvo significación en T4 ( $p < 0,05$ ).

**Figura 26.** Porcentaje de parasitación y conversión (respecto a T1) en las colonias tratadas con ácido tánico.

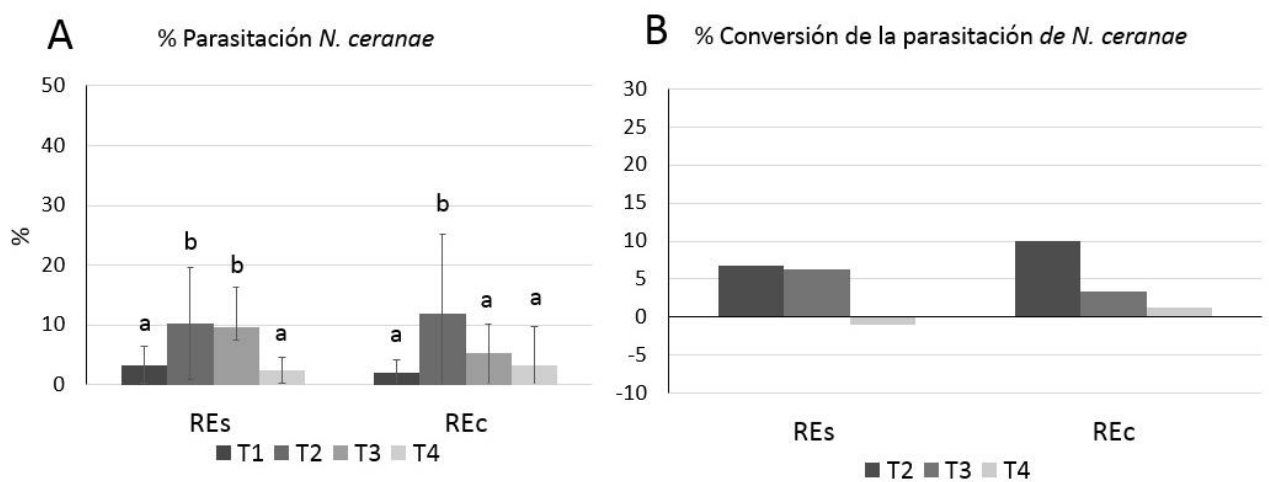


### 1.6. Colonias tratadas con resveratrol

El grupo de colonias tratadas con resveratrol mostraron un aumento del porcentaje de parasitación entre T1-T2 superior al de los otros tratamientos, tanto en la administración con jarabe como con *alimento semi-sólido* (figura 27A).

Los tratamientos con resveratrol en otoño mostraron un aumento significativo en el porcentaje de parasitación (figura 27 A y B), mostrando valores más altos en T2 que en T1 ( $p < 0,05$ ). Al inicio de los tratamientos en primavera (T3) los valores se mantuvieron similares a los de T2 en el grupo al que se le administró resveratrol en jarabe (REs) y por el contrario se redujo ligeramente al que se le administró en alimento semi-sólido ( $p < 0,05$ ). Como en el resto de grupos, en T4 se observó una reducción en el porcentaje de parasitación ( $p < 0,05$ ).

**Figura 27.** Porcentaje de parasitación y conversión (respecto a T1) en las colonias tratadas con resveratrol.



\*Letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



## 2. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE INFECCIÓN POR *N. ceranae* ENTRE LOS GRUPOS TRATADOS Y LOS NO TRATADOS.

Al comienzo de experimento (**T1**) todos los grupos presentaban un nivel de parasitación similar (ANOVA,  $F = 2,723$ ,  $p < 0,05$ ). A pesar de establecer un reparto al azar de las colonias en los diferentes grupos, las colonias perteneciente al grupo NF presentaron el mayor porcentaje promedio de parasitación (% parasitación promedio  $\pm$  d.s., NF,  $22,00 \pm 13,69$ ) y el grupo destinado al resveratrol en alimento semi-sólido (REc,  $2,00 \pm 2,19$ ) que fue el más bajo tuvo (figura 28).

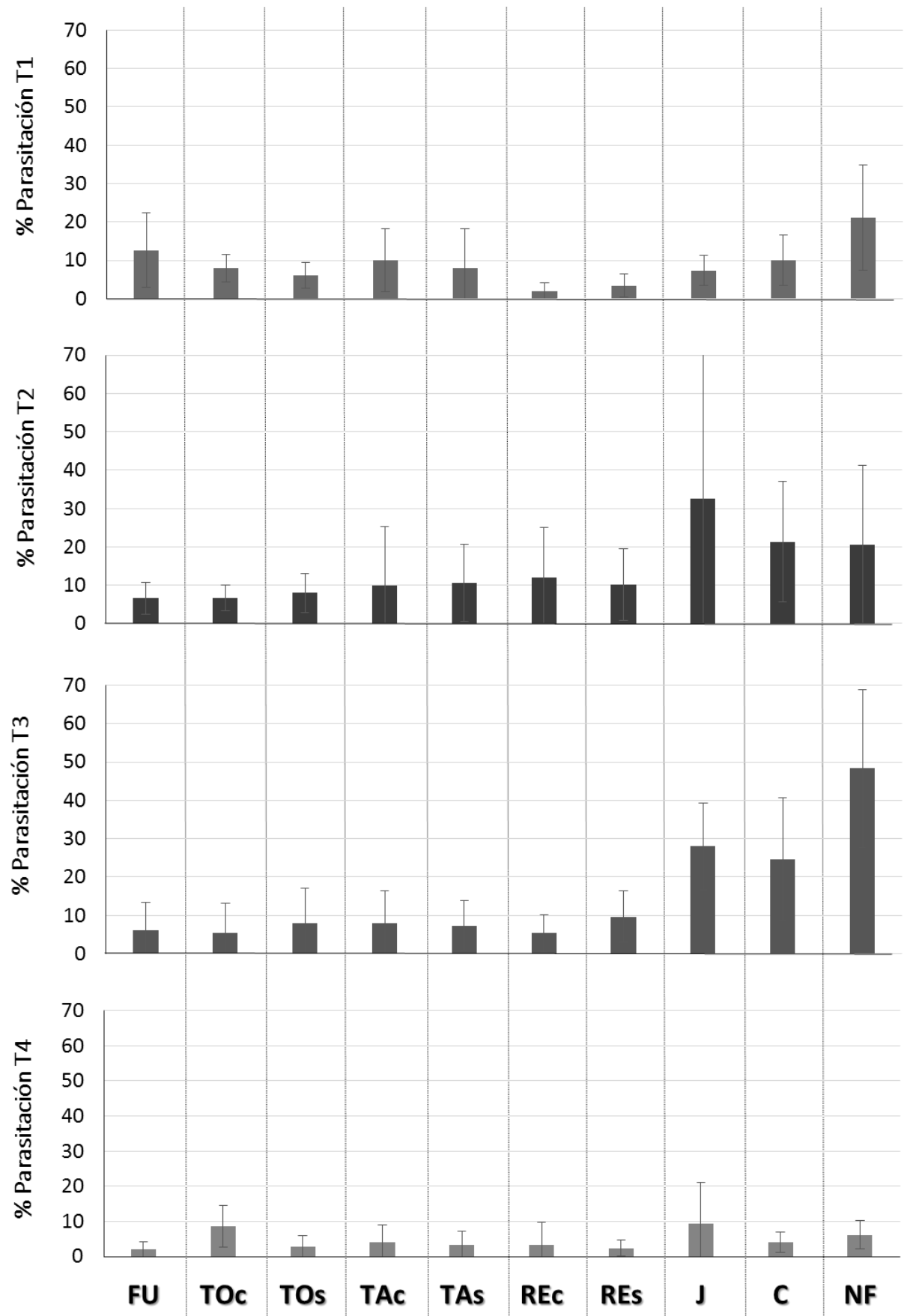
Los resultados obtenidos después del tratamiento de otoño (**T2**) tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA T2;  $F = 1,160$ ,  $P = 0,341$ , figura 28). En este muestreo se observa que los grupos más parasitados se encontraron siempre en los testigos sin tratamiento (%; S:  $32,67 \pm 41,98$ ; C:  $23,33 \pm 15,73$ ; NF:  $20,00 \pm 20,73$ ) y los menos parasitados fueron grupos tratados con fumagilina (%; FU:  $6,67 \pm 4,13$ ), y toltrazuril en alimento semi-sólido (%; TOc:  $6,67 \pm 3,27$ ) aunque las diferencias fueron menores.

A pesar de que todas las colonias tenían niveles de parasitación similares al principio del estudio, el porcentaje de parasitación observado al final del otoño (T2) mostró, que todas las colonias tratadas tenían los porcentajes de parasitación más bajos a los de las colonias testigos no tratadas, si bien estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ , figura 28).

Las colonias de todos los grupos que recibieron tratamiento mostraron al inicio de la primavera (**T3**), un porcentaje de parasitación significativamente inferior al registrado en grupos sin tratamiento (ANOVA,  $F = 7,160$ ,  $p < 0,0001$ , figura 28).

Por último, el porcentaje de parasitación obtenido en el último muestreo post-tratamiento de primavera (**T4**), mostró una disminución generalizada en todos los grupos excepto en el grupo tratado con toltrazuril en alimento semi-sólido. Sin embargo no se observaron diferencias significativas entre todos los grupos (*Levene*  $p = 0,590$ , ANOVA,  $F = 1,167$ ,  $p = 0,338$ ). No obstante el grupo con menor carga parasitaria sigue siendo la fumagilina (%; FU;  $2,00 \pm 2,19$ ) y la más alta el grupo alimentado con jarabe (%; S;  $9,33 \pm 11,78$ , figura 28).

**Figura 28.** Porcentaje de parasitación entre todos los puntos de muestreo y grupo.



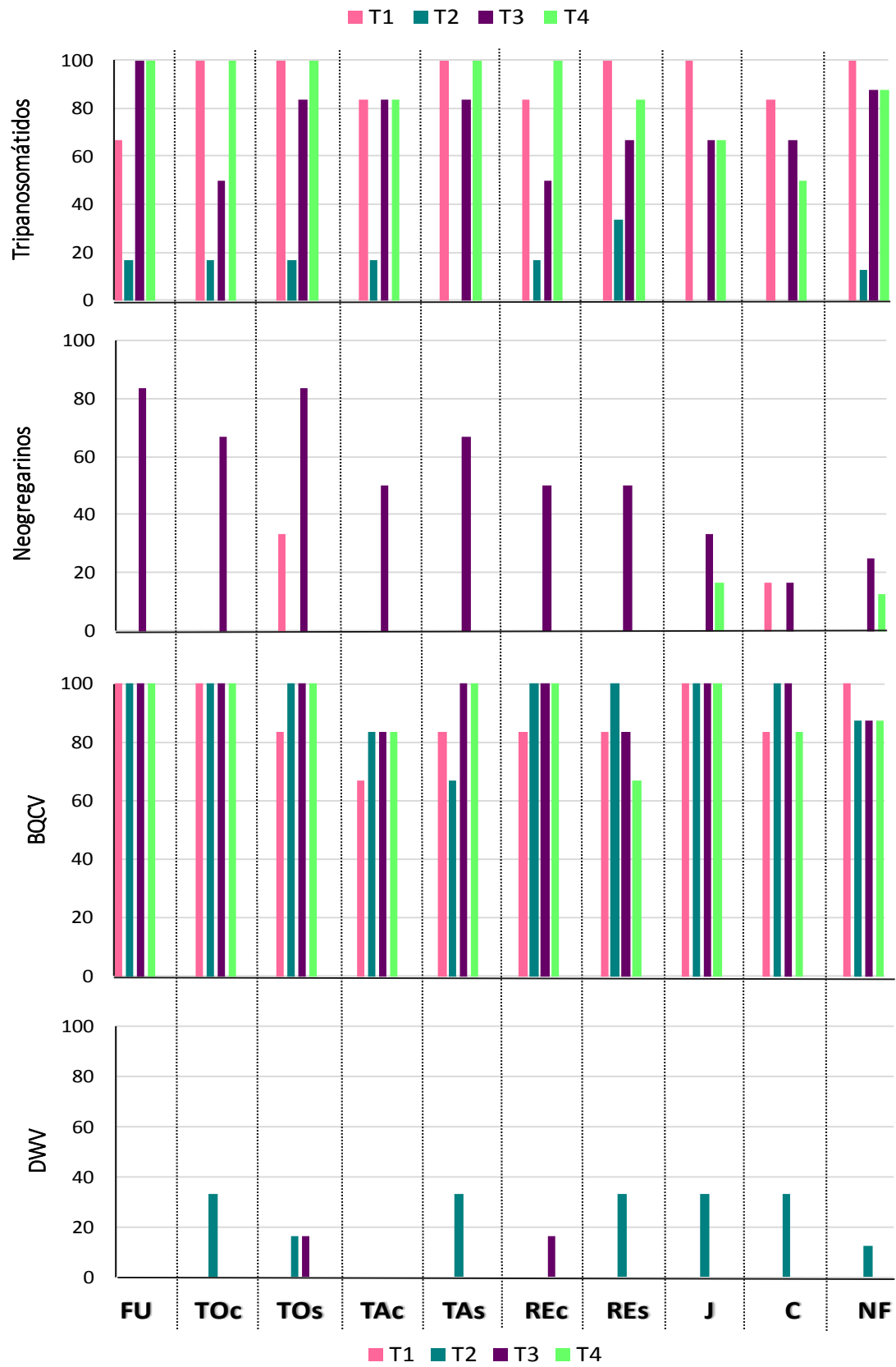
### 3. PORCENTAJE DE COLONIAS POSITIVAS A OTROS PATÓGENOS

El porcentaje de colonias positivas a tripanosomátidos fue elevado durante todo el ensayo en todos los grupos excepto en T2, que fue cuando se alcanzaron los niveles más bajos, incluso negativos en algunos grupos. Estos resultados pueden sugerir una cierta estacionalidad que relaciona el mayor número de colonias positivas a tripanosomátidos en épocas de floración como es el principio del otoño (T1) y en primavera (T3 y T4), disminuyendo drásticamente en el periodo más frío de este ensayo (T2) (figura 29).

En el caso de los neogregarinos los resultados también mostraron una posible estacionalidad, encontrándose que solo en T3 fue donde todos los grupos de colonias estuvieron parasitadas.

En cuanto a los virus, se observa una parasitación homogénea en todos grupos, siendo prácticamente la totalidad de las colonias positivas a BQCV durante todo el ensayo con pequeñas variaciones entre los puntos de muestreo, al contrario que el virus DWV que solo aparece en T2 en todos los grupos sugiriendo, de nuevo, una estacionalidad (figura 29).

**Figura 29.** Porcentaje de parasitación de Tripanosomátidos, neogregarinos, BQCV y DWV, en cada grupo de tratamiento en los diferentes puntos de muestreo.



### 3.1. Comparación del porcentaje de colonias positivas a otros patógenos entre los grupos tratados y los no tratados.

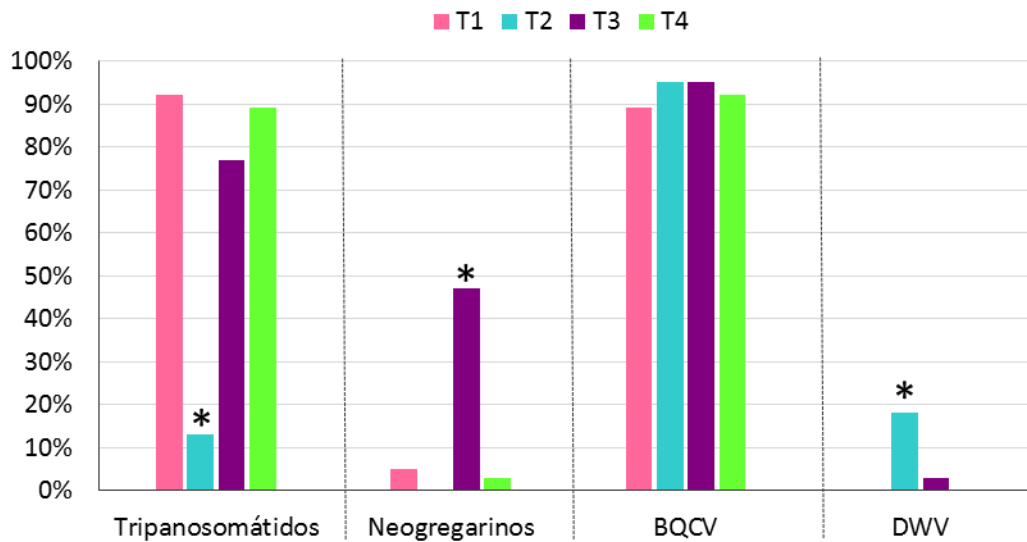
Como se ha comentado en el apartado anterior, no se observaron diferencias significativas en la variación de tripanosomátidos, neogregarinos y virus estudiados entre los diferentes grupos y dado los pocos estudios publicados hasta el momento sobre las variaciones estacionales de estos patógenos, se agruparon todos los resultados obtenidos de las colonias, para cada agente, estableciendo el porcentaje de colonias parasitadas en cada momento de muestreo (T1 – T4), confirmando las diferencias significativas para algunos de los patógenos entre los distintos puntos de muestreo. En el caso de los tripanosomátidos y neogregarinos se observó una estacionalidad a lo largo del ensayo, al igual que lo observado en análisis individual por grupo. En el caso de los tripanosomátidos el 90% de las colonias en T1 fueron positivas a estos agentes, mostrando una alta prevalencia a principios de otoño. Esta prevalencia disminuyó drásticamente a niveles del 16% en T2 ( $p < 0,05$ ), coincidiendo con la finalización del otoño (y época de pecoreo). De nuevo, en primavera los niveles incrementaron al 73% en T3 y 93 % en T4, correspondiendo con el tiempo de floración, pecoreo de las abejas y altas temperaturas (figura 30). Aunque inicialmente la disminución observada en T2 podría sugerir que el tratamiento administrado tiene un efecto directo contra los tripanosomátidos, pero este hecho se da de forma homogénea tanto en colonias tratadas como en las no tratadas (figura 29). No obstante, tal efecto no se observa en T4 de forma que este resultado sugiere que la disminución en T2 se deba a un efecto en la variación de las condiciones ambientales.

Dado que la PCR utilizada en la detección de tripanosomátidos no permitía identificar a nivel de especie, se seleccionaron de forma aleatoria colonias positivas a tripanosomátidos y se realizó un análisis más profundo en cada uno sus puntos de muestreo. Estas fueron secuenciadas y comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos (*Gen Bank*, NCBI), mostrando todas ellas un porcentaje de similitud con la secuencia de *Lotmaria passim* (>99%).

Los neogregarinos presentaron baja prevalencia a lo largo del estudio, excepto al inicio de la primavera (T3) que alcanzaron el 43 % de colmenas positivas ( $p < 0,05$ : figura 30), independientemente de tratarse de colonias tratadas o no tratadas. Esto sugiere que el inicio de la primavera es el momento óptimo para la multiplicación y/o transmisión de estos patógenos.

El virus de las realeras negras (BQCV) fue el más prevalente durante todo el ensayo, oscilando entre un 86% en T1 y un 95% y 93% en T3 y T4 respectivamente, no observándose ningún efecto de la época del año en los niveles de prevalencia. En cambio DWV fue menos prevalente, apareciendo principalmente en T2 con el 18% de colonias positivas (figura 30).

**Figura 30.** Representación del porcentaje de colonias positivas a otros patógenos.



\*Diferencias estadísticamente significativas respecto al resto de puntos de muestreo ( $p < 0,05$ ).

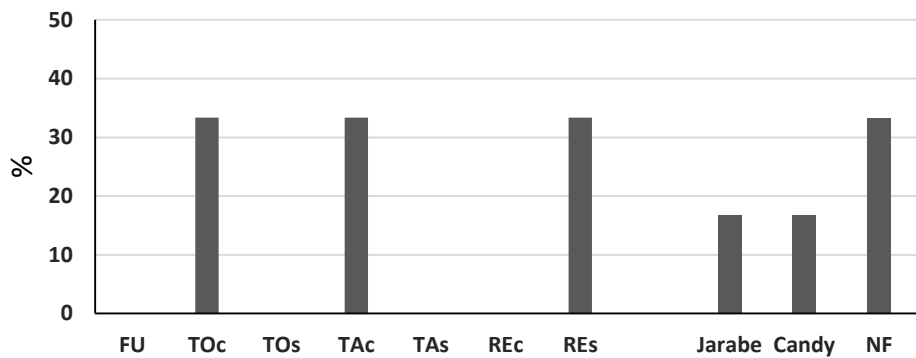
#### 4. MORTALIDAD DE LAS COLONIAS

Este ensayo no se diseñó para evaluar la mortalidad de las colonias infectadas por *N. ceranae*, ya que la nosemosis es una enfermedad cuyos síntomas se perciben a partir del segundo año. A pesar de ello se anotaron el número de colonias muertas en cada grupo.

En la figura 31, se observa que los grupos TOc, TAc, Res y NF tuvieron una mortalidad del 33%, y J y C del 18%. De hecho en todos los grupos a los que no se les administró tratamiento (J, C y NF) se produjo la pérdida de algunas de sus colonias en comparación a los grupos tratados. Estos datos podrían indicar que la administración de alguno de los tratamientos como fueron la fumagilina, el toltrazuril, el ácido tánico y el resveratrol (FU, TOs, TAs y REc) mejoraron el estado sanitario de las colonias.

Todas las colonias que murieron presentaron los mismos síntomas que fueron, un aumento del número de zánganos y pérdida de la reina. La muerte de las colonias se produjo siempre en T2 y el T4, puntos en los que se realizó el análisis completo de la colonia (recuentos del número de cría y abeja adulta). Por ello, es posible que la mortalidad observada se debiese al manejo realizado en las colonias durante el ensayo (método Liebefeld).

Figura 31. Porcentaje de mortalidad de los grupos.

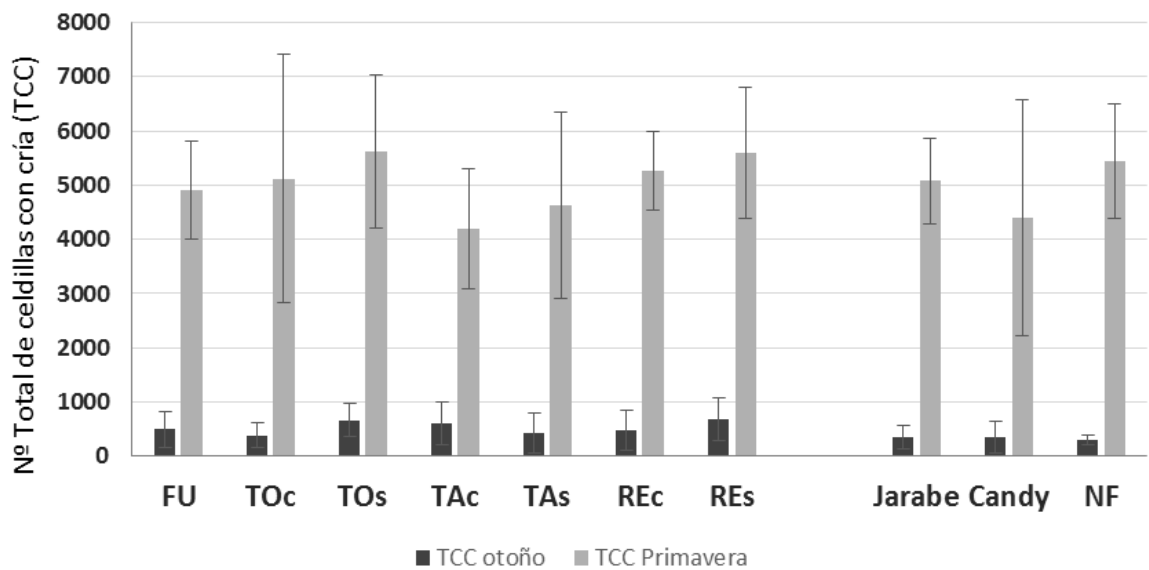


5. RESULTADOS DEL VIGOR DE LA COLONIA Y PRODUCCIÓN DE MIEL

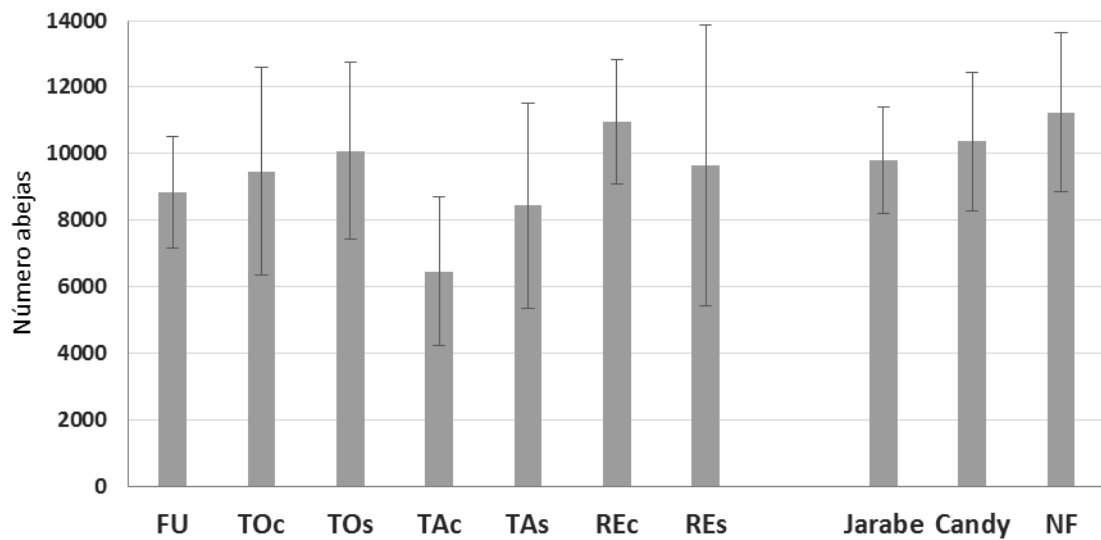
No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores obtenidos de superficie de cría (T1 y T3), número de abejas (T4), y producción de miel (T4) al final de la temporada (ANOVA en número de abejas  $F = 0,557$ ,  $p = 0,823$ , número de cría  $F = 0,795$ ,  $p = 0,623$ , producción de miel  $F = 1,607$ ,  $p = 0,142$ ), entre los grupos tratados y los testigos no tratados.

Todas las colonias mostraron la dinámica natural de una colonia aumentando el número de celdillas con cría de otoño a primavera (figura 32). Del mismo modo no hubo diferencias en el número de abejas adultas entre grupos en T4 ( $p > 0,05$ , figura 33). A pesar de que el grupo TAc fue el que menor población mostró, no se observa ninguna relación que lo asocie a la parasitación de este grupo durante el ensayo.

Figura 32. Representación del número de celdillas con cría en otoño y primavera.

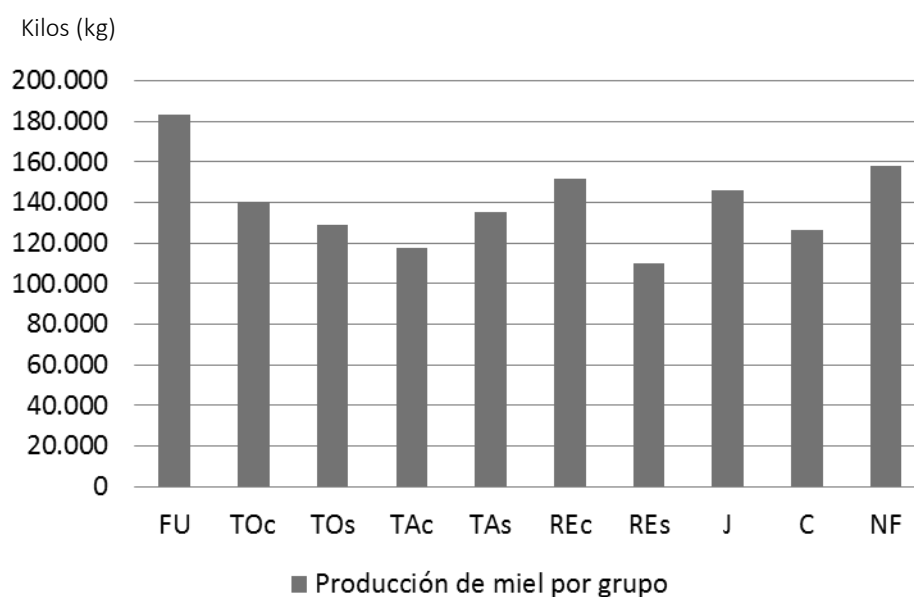


**Figura 33.** Representación del número de abeja adulta en primavera.



En cuanto a la producción de miel en los diferentes grupos, el grupo tratado con fumagilina fue el que más producción de miel mostró al final del ensayo, si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas al comparar todos los grupos ( $p > 0,05$ ; figura 34). Curiosamente el segundo grupo que más miel proporcionó fue el grupo NF, aun siendo uno de los grupos que más mortalidad tuvo (figura 34).

**Figura 34.** Producción bruta de miel por grupo (Kg).





## DISCUSIÓN DEL ENSAYO DE CAMPO

En los últimos años numerosos productos comerciales han sido evaluados para el control de la nosemosis, como por ejemplo el ApiHerb® (Giacamelli y col., 2009; Nanetti y col., 2009), el Nosoz® (Békési y col., 2009), los aceites esenciales (Maistrello y col., 2009), el Nosestat®, el Vitafeed®, el salicilato de fenilo (Botías y col., 2013a), la inulina (Ptaszynska y col., 2015), el Hive Alive™ (Charistos y col., 2015), el Nozevit® (Gajger y col., 2009, 2011), las sustancias pro-bióticas (ácidos orgánicos) que mejoran la flora bacteriana del ventrículo de la abeja (Maggi y col., 2013; Ptaszynska y col., 2015), el agua acidificada compuesta por ácidos orgánicos (Provigoro®, Tsagkarakis y col., 2015) y el ácido oxálico (Nanetti y col., 2015). Algunas han demostrado disminuir la carga parasitaria de las colonias de abejas a las que se les administró en condiciones de campo, como son el Hive alive®, el Nozevit®, las sustancias pro-bióticas y el Provigoro®.

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de disminuir la carga parasitaria en colonias infectadas con *N. ceranae* en condiciones de campo, tras la administración de varias sustancias seleccionadas en ensayos previos.

Independientemente del grupo y el punto de muestreo, *N. ceranae* estuvo presente a lo largo del estudio en las colonias de abejas, en cambio *N. apis* solo apareció en otoño de manera puntual en algunas colonias. Este resultado coincide con los obtenidos por otros autores, que describen la estacionalidad de *N. apis* (Bailey, 1955) y su baja prevalencia en nuestro país (Martín-Hernández y col., 2007, 2012), a diferencia de lo descrito en Alemania donde *N. apis* es el microsporidio más prevalente (Giesrsch y col., 2009; Gisder y col., 2010).

El mejor parámetro para estudiar la evolución de la infección por *N. ceranae* es el **porcentaje de parasitación** en las abejas de interior (Botías y col., 2012b), donde el parásito es menos prevalente (Higes y col., 2008; Martín-Hernández y col., 2012; Smart y col., 2012). Dado que la probabilidad de que las abejas se infecten aumenta con la edad, la detección de este microsporidio es más frecuente en las abejas pecoreadoras que en las de interior (Schmid-Hempel y col., 1994; Higes y col., 2008; Botías y col., 2012a), por ello las abejas pecoreadoras son las utilizadas para diagnosticar la infección a nivel de la colonia. Sin embargo, el posible efecto que puede ejercer un tratamiento, se observa mejor en las abejas de interior, puesto que al administrar el tratamiento son estas las que principalmente lo consumen, y además son las encargadas de mantener la homeóstasis de la colonia (Higes y col., 2013a).

Es importante destacar que a pesar de trabajar inicialmente con colonias homogéneas (igual número de cuadros de cría y abeja), desde el punto T1 del estudio se observó una alta **variabilidad** en el porcentaje de parasitación de *N. ceranae* entre todas las colonias del ensayo. Esto se debió a la presencia de varias colonias entre todos los grupos, que presentaban unos valores en el porcentaje de parasitación que se encontraban muy por encima o muy por debajo de la media durante todo el estudio. A pesar del reparto aleatorio realizado al inicio del ensayo, fue en los grupos sin tratamiento (J, C y NF) donde se encontraron las colonias con porcentajes más altos al principio del ensayo. Este dato inicial podría resultar un problema en la valoración final de los resultados, sin embargo la infección de *N. ceranae* en estos tres grupos de colonias tuvo un incremento mucho mayor en T2 y T3 al de cualquier colonia tratada, este incremento de la parasitación es el esperado en una colonia donde no se controla la parasitación por *N. ceranae* (Botías y col., 2013a).



Del mismo modo que lo observado en el trabajo de laboratorio, el **consumo** adecuado del tratamiento es de vital importancia para evaluar su eficacia. En este trabajo se volvió a observar como una concentración elevada de ácido tánico generó un rechazo del mismo, observándose un consumo muy reducido de este tratamiento en otoño, independientemente de ser administrado en jarabe o alimento semi-sólido. En cambio, el resto de tratamientos tuvieron un adecuado consumo, equivalente al ya observado en el laboratorio.

La **fumagilina** sigue siendo el tratamiento que mayor eficacia presenta en condiciones de campo, aunque actualmente está prohibido su uso en Europa (Botías y col., 2013a; van der Heever y col., 2014). La fumagilina no previene la re-infección, ya que algunos estudios mostraron que después de largos periodos de aplicación de esta sustancia, las colonias vuelven a re-infectarse (Williams y col., 2008b; Botías y col., 2013a). Además, distintos estudios han mostrado que esta sustancia tiene acción genotóxica, mutagénica y tiene capacidad de dañar la flora bacteriana de la abeja, la cual forma una barrera esencial frente a patógenos intestinales, de forma que no se descarta un impacto negativo las abejas (Stanimirovic y col, 2007; Eischen y col., 2012; Koch y Schmid-Hempel, 2011).

En el grupo tratado con fumagilina se observó una disminución de la carga parasitaria de *N. ceranae*, a lo largo de todo el ensayo en abejas de interior aunque sin llegar a obtener colonias libres de parasitación. Datos que se oponen a los descritos en estudios previos donde la administración de esta sustancia mostró una rápida disminución de la carga parasitaria de *N. ceranae* (Gregorc y Sulimanovic, 1996; Higes y col., 2008, 2011). Los estudios realizados por Huang y colaboradores (2013) sugieren la aparición de una posible resistencia de *N. ceranae* a este antibiótico, lo que podría explicar porque en este estudio no se ha obtenido la misma eficacia en la aplicación de fumagilina que otros autores. El seguimiento y tratamiento durante un periodo más prolongado ayudará a dilucidar la existencia o no resistencia a la fumagilina por *N. ceranae*.

A pesar del bajo consumo del tratamiento con **ácido tánico**, los grupos de colonias de abejas tratadas con ácido tánico, mostraron resultados similares independientemente de si se aplicó el tratamiento en jarabe o en alimento semi-sólido. A pesar de ser el único grupo cuyo consumo fue muy bajo en otoño en ambos tipos aplicación, si se mostró una clara reducción del porcentaje de abejas de interior infectadas con *N. ceranae* en T2, T3 y, como efecto de la dilución natural por el aumento del número de abejas, también en T4. Sin embargo, al igual que en resto de grupos, las diferencias estadísticas no fueron significativas en T2 y T3.

Las colonias que fueron tratadas con **toltrazuril** mostraron diferencias significativas únicamente en T4. Estos resultados no se asemejan a los obtenidos por Rodríguez y colaboradores (2009) donde tras aplicar el tratamiento en jarabe observaron una disminución en la carga parasitaria.

Las colonias de abejas que fueron tratadas con **resveratrol** no mostraron ninguna reducción en el porcentaje de parasitación de las colonias en otoño, ni en primavera administrándoles más concentración del tratamiento. De manera que estos datos no apoyan los anteriormente obtenidos en el CIAPA (Informe proyecto RTA 2009-00105-C02), ni al de otros autores que utilizan concentraciones más reducidas (Leiro y col., 2004; Maistrello y col., 2008; Costa y col., 2010). En este estudio se probaron dosis inferiores a las que mostraron eficacia en los estudios realizados anteriormente en el CIAPA. De hecho, el principal objetivo por el que se incluyó el resveratrol en este estudio fue para determinar si

era posible reducir la dosis de 7 g/l (usado en el proyecto RTA 2009-00105-C02) ya que se había detectado una elevada acumulación de residuos en miel, y además de que una reducción en la dosis podría abaratar los costes del tratamiento. Sin embargo la dosis de 3 g/l o 5 g/l, no mostraron efecto.

Los resultados obtenidos considerando todas las **colonias como un solo grupo** y analizando cada **punto de muestreo**, no se observan diferencias estadísticamente significativas después del primer tratamiento (**T1-T2**). A pesar de ello, si se observa en el grupo de los testigos negativos (colonias no tratadas) una tendencia a aumentar su carga parasitaria, al contrario que en los grupos tratados cuyo aumento fue leve o se mantuvieron.

En cambio al inicio de la primavera (**T3**) ya se observaron claras diferencias entre los grupos tratados respecto a los no tratados, es decir, las colonias tratadas con alguno de los productos en otoño (T1) llegaron a la primavera (T3) en mejores condiciones sanitarias que los grupos no tratados, cuyo porcentaje de parasitación fue mucho mayor. Esto sugiere que el tratamiento en otoño con cualquiera de los productos analizados ayudó a contener la carga parasitaria de *N. ceranae*, alcanzando la primavera en buenas condiciones sanitarias. Sin embargo en el caso del resveratrol estos resultados no se asemejan a los obtenidos por otros autores que observan una reducción de la carga parasitaria por *N. ceranae* (Maistrello y col., 2008; Costa y col., 2010), y en el toltrazuril (Rodríguez y col., 2009). Estas diferencias se deben probablemente a diferencias en la metodología y condiciones experimentales, como las dosis ensayadas. Sin embargo estudios futuros deben dirigirse a dilucidar la eficacia o no del resveratrol. En este análisis destacan el ácido tánico y el toltrazuril administrado en jarabe, por ser los más eficaces (junto a la fumagilina) reduciendo la carga parasitaria.

Por último, los resultados obtenidos al final de la primavera (**T4**), mostraron diferencias estadísticamente significativas en todos los grupos respecto al punto T1, T2 y T3 (ANOVA  $p < 0.001$ ). Este efecto no estuvo ligado al tratamiento, ya que los testigos negativos también disminuyeron su carga parasitaria. Probablemente se debió al aumento del número de abejas que se da de forma natural en esta época, el cual diluye el porcentaje de parasitación de *N. ceranae* debido a que las abejas jóvenes tienen menos probabilidad de estar infectadas por el microsporidio (Botías y col., 2013a). Además estos resultados apoyan resultados previos (Botías y col., 2013a) que sugieren que un solo tratamiento de otoño sería suficiente, ya que en primavera se produce este mecanismo de dilución natural. Por el lado contrario Traver y Fell, (2012) sugieren que si la parasitación de las colmenas por *N. ceranae* es baja en invierno, no sería necesario realizar ningún tratamiento, sin embargo en este trabajo se observó un claro aumento de parasitación en las colmenas no tratadas (J, C y NF).

El tipo de tratamiento administrado a las colonias no mostró ningún efecto sobre otros patógenos como los **tripanosomátidos** y **neogregarinos**. En este trabajo la aparición de los tripanosomátidos coincide con el momento de mayor actividad en una colonia que es al final de verano principios de otoño (T1), disminuyendo drásticamente a finales de otoño y principios de invierno (T2), y reemergiendo en primavera (T3 y T4). Existe actualmente cierta controversia alrededor de qué especie es la que está parasitando a la abeja melífera (Stevanovic y col., 2016; Ravoet y col., 2015; Schwarz y col., 2015), por ello nos llevó a analizar las muestras que previamente habían resultado positivas a tripanosomátidos y tras su secuenciación y comparación en las bases de datos, resultó ser *Lotmaria passim*. Sin embargo, hay ciertas dudas sobre la clasificación taxonómica de estas especies (Stevanovic y col., 2016; Ravoet y col., 2015; Schwarz y col., 2015), por lo que en este estudio hemos preferido referir a este grupo como tripanosomátidos. De hecho, también hay cierta discusión sobre su efecto



patógeno en las colonias (Higes y col., 2016). En nuestro trabajo su presencia, no se asocia con síntomas en las colonias, si bien es necesario profundizar en su efecto patógeno.

Los neogregarinos (*Apicystis bombi*, Meeus y col., 2010) también mostraron una estacionalidad por su significativa aparición en el mes de mayor actividad de las colonias (T3).

Recientemente, numerosos estudios han subrayado el papel de las **infecciones virales** en las pérdidas de colonias de abejas con resultados dispares (Genersch y col., 2010; Runckel y col., 2011; Tentcheva y col., 2004; Gauthier y col., 2007; Cox-Foster y col., 2007; Nielsen y col., 2008; Granberg y col., 2013; Cornman y col., 2012). El diseño experimental de muchos de estos estudios puede ser la respuesta a tal diversidad en los resultados. En la mayoría de los casos, el período de estudio fue de un año o inferior, las colonias fueron analizadas una o dos veces en todo el ensayo y el tejido de la abeja utilizado para la extracción por RT-PCR es muy diverso entre estudios, de manera que los resultados no son comparables (McMeanmin y Genersch, 2015). De igual manera, en este trabajo no se puede concluir el efecto que provoca la carga vírica de las colonias analizadas, ya que el diseño del estudio no se elaboró para ese fin y solo pretendíamos tener más datos complementarios sobre el estado sanitario de las colonias del estudio. Se observó que la mayoría de las colonias estudiadas estaban infectadas por el virus de las realeras negras (**BQCV**), independientemente del punto de muestreo y del tratamiento. Estos resultados se oponen a los obtenidos por Runckel y colaboradores (2011) cuya prevalencia es máxima únicamente en los meses de verano. Del mismo modo Berenyi y colaboradores, (2006) observaron un aumento del virus en los meses de primavera y verano. Además se ha sugerido una relación directa entre BQCV y *N. ceranae* (Bailey, 1991; Tentcheva y col., 2004; Berenyi y col., 2006), datos que coinciden con este ensayo ya que tanto para BQCV como *N. ceranae* la detección fue en la mayoría de las colonias del 100% a lo largo de todo el estudio.

Varios trabajos muestran que **DWV** es el virus que mayor prevalencia tiene en el mundo (Allen y Ball, 1996; Tentcheva y col., 2004; Berenyi y col., 2006; Baker y Schroeder, 2008; Ai y col., 2011). Sin embargo en este estudio el virus mostró unos bajos niveles de prevalencia. La documentada relación entre el virus de las alas deformadas con el ácaro *V. destructor* (Bowen-Walker y col., 1999; Nordstrom y col., 1999; Tentcheva y col., 2004; Yue y Genersch, 2005; Miranda y Genersch 2010; Genersch y Aubert, 2010; Guzman-Novoa y col., 2012b; Dainat y col., 2012) y el tratamiento contra este ácaro realizados dos veces en el ensayo, puede explicar la baja prevalencia del mismo durante el ensayo.

Una mayor proporción de cría en las colonias más infectadas puede ser el reflejo del esfuerzo que la reina realiza, incrementando la cría, en un intento de reemplazar a las abejas obreras perdidas por la infección de *N. ceranae* (Farrar, 1947; Yücel y col., 2005; Higes y col., 2008). En nuestro estudio no se observaron diferencias entre los grupos tratados y no tratados en el **número de abejas adultas**, **número de cría** o **producción de miel** (Meikle y col., 2008), a pesar de que el grupo alimentado con fumagilina mostró una producción de miel mayor al resto, aunque no estadísticamente significativo.

Los resultados confirman que las manifestaciones clínicas ocasionadas por la infección por *N. ceranae* pueden no ser totalmente evidentes en un solo año de evolución en campo. Además niveles altos de parasitación están asociados a la aparición de otras enfermedades como Loque americana o ascosferosis, además de disminuir el tratamiento frente a *V. destructor*. Sin embargo este trabajo no se diseñó para determinar la mortalidad de las colonias a causa de la infección por *N. ceranae*, sino la

eficacia de los tratamientos en la reducción del microsporidio. No obstante se incluyó este parámetro ya que en alguna ocasión si se ha producido una mortalidad significativamente superior en los grupos a los que no se les realizó un control frente a *N. ceranae* (Botías y col., 2013a). En este caso se observó que en TOc, TAc y REs y en todos los grupos sin tratamiento (J, C y NF) tuvieron mortalidad en sus colonias, siendo más alta en el grupo que no se alimentó con nada (NF). Sin embargo, todas las colonias muertas mostraron los mismos signos (aumento del número de zánganos y pérdida de la reina). Puesto que no se pudo establecer ninguna correlación entre la mortalidad y el nivel de infección de *N. ceranae* en las colonias se consideró que la mortalidad observada se debió en realidad al manejo realizado sobre las colonias, principalmente el utilizado para la determinación de la población de la colonia (método Liebefeld). Este método consiste en sacar todos los cuadros de la colmena para estimar el número de abejas, existiendo el riesgo de dañar o matar accidentalmente a la reina.

La producción de miel más elevada se observó en el grupo tratado con fumagilina, seguido de los grupos NF y REc. Por otro lado la baja mortalidad observada en los grupos J y C respecto a los grupos tratados, podría indicar que estamos ante la presencia de colonias que pudieran haber desarrollado tolerancia a la infección por el parásito. En esta misma línea hay trabajos que encuentran colonias que mantienen su porcentaje de parasitación muy estable durante el tiempo, sugiriendo que las diferencias de mortalidad observadas por este patógeno pueden deberse o bien a diferencias en la metodología aplicada o a la susceptibilidad del hospedador al patógeno, o viceversa, ocasionada por los cambios en la diversidad genética de ambos a lo largo del tiempo (Huang y col., 2012; Jara y col., 2015; Kurze y col., 2016b).

En resumen, una única aplicación del tratamiento durante el otoño sería suficiente para mantener bajos los porcentajes de parasitación evitando los efectos negativos que *N. ceranae* puede ocasionar a una colonia de abejas. La fumagilina sigue siendo el tratamiento que mejor controla la parasitación por *N. ceranae*. No obstante la administración de otras sustancias (ácido tánico, el toltrazuril, resveratrol) pueden ayudar a controlar la parasitación, al menos evitando que esta aumente y ayudando a las colonias a llegar en las mejores condiciones a la primavera. La concentración de ácido tánico debe de ajustarse en futuros ensayos de campo para conseguir un mayor consumo, que probablemente mejorará la eficacia y obtener resultados similares a los obtenidos en los ensayos de eficacia en laboratorio. La aplicación y seguimiento de los tratamientos durante períodos más largos son necesarios para conocer la eficacia real de estos productos.

## CAPÍTULO III





## CAPÍTULO III

### Nuevas alternativas metafilácticas y terapéuticas de base molecular.

El desarrollo que las herramientas moleculares han alcanzado en los últimos años permite abordar el tratamiento de las enfermedades desde una nueva perspectiva. La búsqueda de dianas terapéuticas permite conocer los lugares específicos en el metabolismo del organismo donde un fármaco ejerce su acción. Estas terapias están dirigidas a inhibir el desarrollo de un parásito, mediante el bloqueo de moléculas diana, generalmente lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, que limitan el desarrollo del organismo y ocasionando la muerte del mismo.

El primer paso para el desarrollo de estas terapias se basa en la identificación de las dianas sobre las que poder ejercer la acción terapéutica. Sin embargo, la información sobre el ciclo biológico de *N. ceranae* es realmente escasa. La mayoría de los estudios de expresión génica relacionados con este microsporidio están enfocados al análisis de genes del hospedador, *A. mellifera* tras la infección con el parásito (Antúnez y col., 2009; Dussaubat y col, 2012; Chaimanee y col., 2012). Sin embargo, en otras especies de microsporidios que infectan otros hospedadores sí se ha analizado la expresión de genes del microorganismo, estableciendo la gran importancia de la interacción parásito/hospedador, como es el caso del gen *SWP26* (*spore wall protein 26*) de *Nosema bombycis* (Zhu y col., 2013) o de la proteína de choque térmico (*Hsp70*) en *Encephalitozoon cuniculi* (Jolly y col., 2010).

Por tanto, para poder desarrollar estas nuevas técnicas moleculares para el control de *N. ceranae* es imprescindible conocer la expresión secuencial de los genes desde el primer momento de su interacción con el hospedador. De esta manera además de ahondar en el conocimiento de su ciclo biológico se podrían identificar genes susceptibles de ser dianas terapéuticas para el diseño de fármacos que ayuden al bloqueo de los mismos.

Por ello en este capítulo se abordan los siguientes objetivos:

- A) Búsqueda de genes diana mediante el análisis de expresión génica de *N. ceranae* en la célula hospedadora.
- B) Control de la nosemosis mediante el silenciamiento de genes diana en *N. ceranae*. Tratamiento con ARN de interferencia.





## CAPÍTULO III.A)

### Búsqueda de genes diana mediante el análisis de expresión génica de *N. ceranae* en la célula hospedadora.

En este capítulo, como paso previo a la identificación de dianas terapéuticas, se realizó un estudio de expresión mediante la determinación del ARNm de *N. ceranae* extraído de abejas experimentalmente infectadas, centrándonos en las primeras fases de la infección.

El ciclo biológico de los microsporidios se divide, a grandes rasgos, en 3 fases (Wittner y Weiss, 1999). La fase infectiva asegura la transmisión del patógeno mediante la inyección del contenido de la espora (**esporoplasma**) en la célula hospedadora a través de una estructura denominada túbulo o filamento polar. En la segunda fase, o fase proliferativa, el esporoplasma toma la forma de **meronte**. La fase de merogonia alberga un número aún indeterminado de divisiones celulares y los merontes utilizan los orgánulos y nutrientes del hospedador para multiplicarse y dar lugar a los **esporontes** que en la fase de esporogonia darán lugar a los **esporoplastos o esporas** inmaduras, las cuales vuelven a germinar dentro de la misma célula o células adyacentes, volviendo a repetir el ciclo. Esta última fase concluye con la formación de esporas maduras o ambientales que saldrán al exterior para comenzar nuevas infecciones (Wittner y Weiss, 1999). La descripción del ciclo de los microsporidios ya sugiere puntos clave donde buscar posibles dianas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. SELECCIÓN DE GENES DE ESTUDIO

Los genes se seleccionan en base a estudios genéticos previos realizados en el grupo de investigación (Maside y col., 2015; Gómez-Moracho y col., 2013). Uno de los genes elegidos fue el que codifica para las proteínas del túbulo o filamento polar (*PTP3*), estructura imprescindible para la fase infectiva. También se seleccionaron dos genes que codifican para proteínas imprescindibles para la replicación génica y para la defensa frente al ataque del propio hospedador, como son la subunidad grande de RNA polimerasa II (gen *RPB1*) y una proteína de choque término (gen *Hsp70*). Estas últimas participan en situaciones de estrés celular ayudando al plegamiento perfecto de las proteínas recién sintetizadas protegiéndolas del estrés celular que les rodea.

Una vez seleccionados los genes diana (todos ellos descritos por ser de copia única), se diseñó el estudio de expresión génica mediante cuantificación por PCR a tiempo real, desde el momento inicial de la infección de la abeja con esporas de *N. ceranae*, hasta las 72 horas post-infección.

### 2. RECOGIDA DE ABEJAS PARA EL TRABAJO EN LABORATORIO

Los cuadros de cría para la obtención de abejas sanas recién nacidas y posterior infección experimental se obtuvieron según lo descrito en apartados anteriores (capítulo II, B.1, pág.54).

### 3. RECOLECCIÓN, NACIMIENTO, MANEJO Y ENJAULADO DE LAS ABEJAS

Todos estos aspectos de la metodología han sido descritos en el apartado anterior (Capítulo II, B.1, pág.54). Se comprobó que las abejas recién nacidas estaban libres de infección por *N. ceranae* mediante un análisis por PCR (Martín-Hernández y col., 2007).

### 4. OBTENCIÓN DE ESPORAS DE *N. ceranae*

La metodología para la obtención de esporas de *N. ceranae* ha sido descrita en el capítulo I (pág.35).

### 5. CONDICIONES GENERALES DEL ENSAYO E INFECCIÓN EXPERIMENTAL

Las condiciones generales del ensayo están descritas en el capítulo II, B.2 (pág. 74), al igual que la infección experimental de la abejas con esporas de *N. ceranae*.

En este caso se utilizaron jaulas de 25 abejas cada una, de ellas 10 jaulas con abejas infectadas, y 3 jaulas testigo sin infectar.

### 6. TOMA DE MUESTRAS

Las muestras se a las 0, 8, 12, 36, 48 y 72 horas post-infección. Para garantizar la obtención de ARN en óptimas condiciones se realizó la extracción del ventrículo *in vivo*. Las abejas se anestesiaron con CO<sub>2</sub> y una vez dormidas se extrajo el aparato digestivo de la abeja mediante tracción con pinzas del

último segmento del abdomen. Sosteniendo aún con las pinzas el aparato digestivo, se seccionó el ventrículo separándolo del resto del aparato digestivo con tijeras de disección estériles.

## 7. ANÁLISIS POR BIOLOGÍA MOLECULAR

El ventrículo se depositó en un tubo con perlas de cerámica que contenía 1 ml de Qiazol (Qiagen®). Se utilizaron 15 ventrículos por punto de muestreo (15 de abejas infectadas y 15 de testigos no infectados) repartidos en 3 tubos que contenían Qiazol (5 ventrículos por tubo). Estos tejidos se almacenaron a temperatura de -80°C hasta su procesado.

### 7.1. Extracción de ARN y retro-transcripción

Una vez introducidos los ventrículos en un tubo con perlas de cerámica que contenía Qiazol® (Qiagen®), se maceraron para romper los tejidos en un *Magna Lyser* (Roche®) durante 90 segundos. Los tubos se centrifugaron durante 1 minuto a 12.000g. La fase acuosa obtenida se trasladó a un tubo nuevo que se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente (15-25°C). Más tarde se añadieron 200 µl de cloroformo y se agitó por inversión varias veces. Se dejó de nuevo a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugó a 12.000g durante 15 minutos a 4°C. De nuevo, la fase acuosa se recuperó y se trasladó a un tubo nuevo donde se continuó con el protocolo de extracción de ARN (*RNAse lipid Tissue Mini*, Qiagen®) incluyendo una fase de digestión con DNAsa (Qiagen®). Para eliminar los residuos que pudieran quedar de los reactivos de la extracción se aplicó el protocolo de limpieza del mismo fabricante (*Clean up*-Qiagen®).

Inmediatamente tras la extracción de ARN éste fue transcrito a ADN copia (ADNc o cDNA) mediante el Kit de retro-transcripción (RetroTranscriptase, Qiagen®) en un volumen final de 40 µl de ADNc. Paralelamente se dispusieron testigos en el proceso de retro-transcripción que sirvieron para confirmar en posteriores PCR la eliminación de ADN genómico. El ADN copia se almacenó a -20°C hasta su uso posterior.

### 7.2. Análisis de expresión de los genes de *N. ceranae* (PCR a tiempo real).

Una vez obtenido el ADNc, se analizó el nivel de expresión de los genes *PTP3*, *RPB1* y *Hsp70* de *N. ceranae*.

El diseño de las parejas de cebadores y la sonda utilizadas se realizó en base a la secuencia de referencia del *GenBank* (Cornman y col., 2009) seleccionando zonas conservadas de estos genes en base a datos obtenidos en anteriores estudios (Gómez-Moracho y col., 2013 y 2014; Maside y col., 2015). Los cebadores y la sonda se diseñaron mediante la utilización del software que Roche® dispone para este fin (*Universal Probe Library single probes*; [https://lifescience.roche.com/en\\_es/brands/universal-probe-library.html](https://lifescience.roche.com/en_es/brands/universal-probe-library.html)). Este software se basa en el diseño de cebadores, sobre las secuencias, compatibles con la sonda de hidrólisis prediseñadas y marcadas con fluorescencia FAM ( $\lambda$ ; 494 nm absorción y 518 nm emisión) en el extremo 5'. Las secuencias diseñadas y condiciones de la PCR se muestran en la tabla 11.

**Tabla 11.** Secuencias diseñadas para el análisis por qPCR para la detección de *N. ceranae*.

| Pareja de cebadores                                 | Gen                 | Referencia <i>Genbank</i> |
|---|---------------------|---------------------------|
| PTP3-Q-For -5'-tgc tga tgt tat ggc tac aga ag-3'    |                     |                           |
| PTP3-Q-Rev -5'-tac aga ttg cgc tgc ttt aa-3'        | <b><i>PTP3</i></b>  | PTP3 XM_002996713         |
| Sonda Roche <b>UPL 72</b>                           |                     |                           |
| CER-RPB1-For -5'-cat aaa aat gca cgt tca gtg g-3'   |                     |                           |
| CER-RPB1-Rev -5'-cat gga gaa tgg gtt ccc ta-3'      | <b><i>RPB1</i></b>  | RPB1 XP_002995402         |
| Sonda Roche <b>UPL 131</b>                          |                     |                           |
| Hsp70-For -5'-ttg aca agt ctg cac agg gta-3'        |                     |                           |
| Hsp70-Rev -5'-tta tcc aaa tct tct cct cct aaa aa-3' | <b><i>HSP70</i></b> | Hsp70 XP_002995428.1      |
| Sonda Roche <b>UPL 52</b>                           |                     |                           |

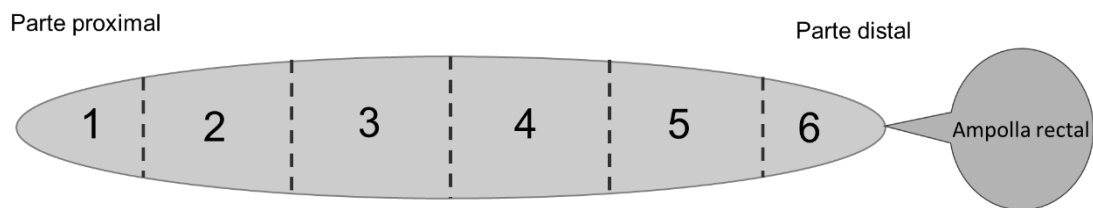
\*Sondas universales (UPL, *Universal Probe Library*) obtenidas de la librería de Roche®. Temperatura de anillamiento preferente para el trabajo con sondas es del 60°C. Cebadores utilizados a una concentración de 20µM, mediante el Kit de PCR; Probe Master Mix Roche® a un volumen final de 25 µl. Termociclador Light Cycler® 480 Roche.

Los niveles de expresión para cada gen se establecieron mediante el valor de **Cp** (*crossing point*, ciclo de amplificación) de cada gen, obtenido en cada punto de muestreo (0, 8, 12, 36, 48 y 72 horas post-infección). Los valores de Cp de cada uno de los genes se calculó a través del algoritmo estadístico Máximo de la 2ª derivada (*Second derivative Maximum*, LightCycler 480 software, Roche®). Cada reacción de PCR se realizó por duplicado, obteniendo un total de 6 valores de Cp por marcador genético y punto de muestreo, del cual se calculó el valor promedio para el análisis cualitativo.

## 8. FIJACIÓN DE TEJIDO PARA MICROSCOPIA

Del mismo modo que los ventrículos utilizados para la extracción de ARN, se recogieron dos ventrículos por cada punto de muestreo y réplica para la observación del desarrollo intracelular del parásito (6 ventrículos por punto de muestreo). Los ventrículos se fijaron para la observación de los daños tisulares y desarrollo del ciclo celular por microscopía electrónica según un procedimiento previamente descrito (Higes y col., 2007). Los estudios se llevaron a cabo en el departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria y el Servicio de Microscopía de la Universidad Complutense de Madrid. Para su análisis, cada ventrículo se dividió en 6 regiones desde la parte proximal a la distal (figura 37). De cada región se realizaron cortes semi-finos que se evaluaron previamente al microscopio óptico para la obtención de una visión panorámica del tejido y seleccionar las regiones para el análisis por microscopía electrónica. Los cortes seleccionados se tiñeron con azul de metileno para su observación en el microscopio óptico.

**Figura 37.** Representación de las zonas elegidas en el ventrículo para los cortes semi-finos para su observación por microscopía óptica.

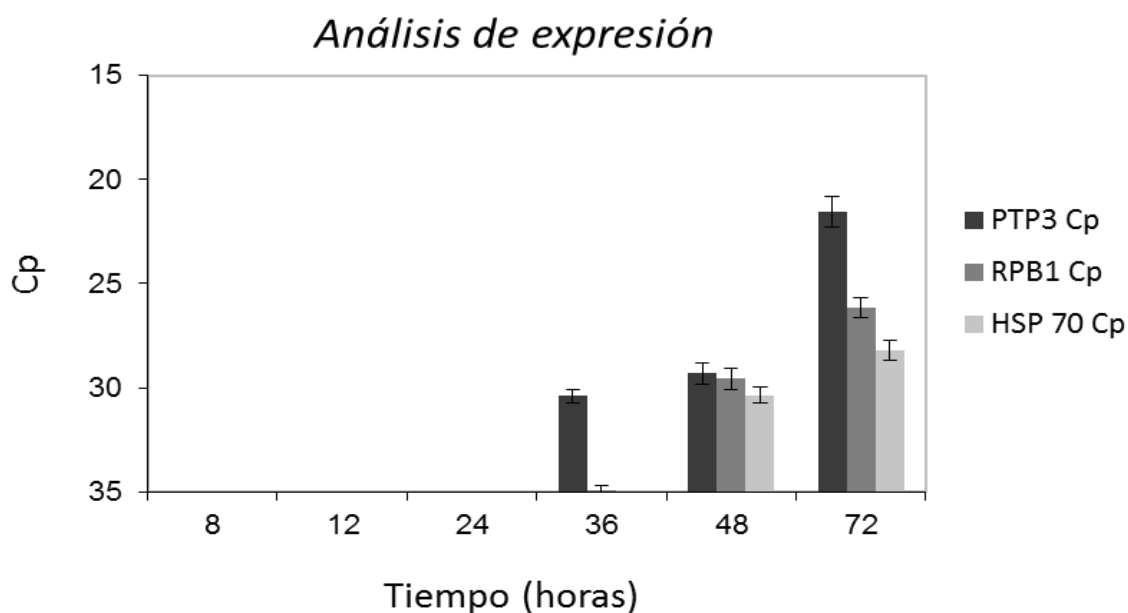


## RESULTADOS

### 1. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES DE *N. ceranae* (PCR)

Los niveles de expresión obtenidos para los tres genes se muestran en la figura 38. La expresión del gen *PTP3* fue la primera en detectarse a las 36 horas post-infección. La expresión en el resto de genes estudiados, *Hsp70* y *RPB1*, se detectaron a las 48 horas post-infección (figura 38), siendo mayor la expresión de *RPB1*. Se observó un incremento gradual en el nivel de expresión de todos los genes a las 48 y 72 horas, de forma que a las 72 horas post-infección dicho nivel de expresión fue superior para los 3 genes evaluados, siendo el valor del *PTP3* el más elevado de todos.

**Figura 38.** Cuantificación del ADNc detectado de los distintos genes a las 8, 12, 24, 36, 48 y 72 horas post-infección.



\*Nótese que los ejes se expresan de forma inversa para facilitar la visualización, ya que a menor valor de Cp, mayor cantidad de ARNm (ADNc) expresado en cada gen. Se expresan los valores promedios de Cp por punto de muestreo y gen.

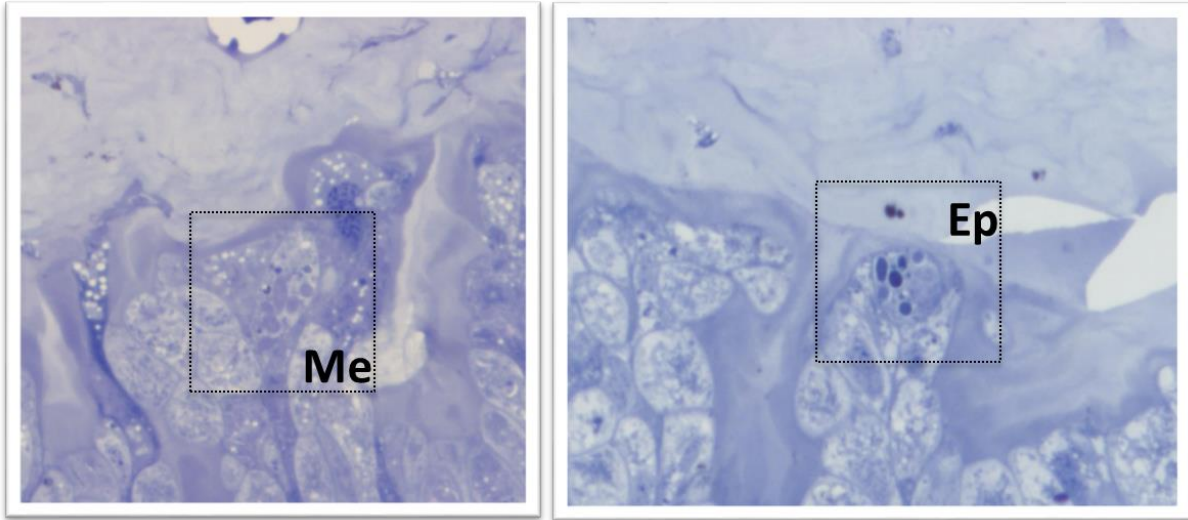
Estos resultados muestran a las 36 horas post-infección que, el gen que codifica para la formación de la proteína del túbulo polar (PTP), se está expresando a unos niveles detectables mediante PCR a tiempo real.

## 2. ANÁLISIS POR MICROSCOPÍA ÓPTICA Y ELECTRÓNICA

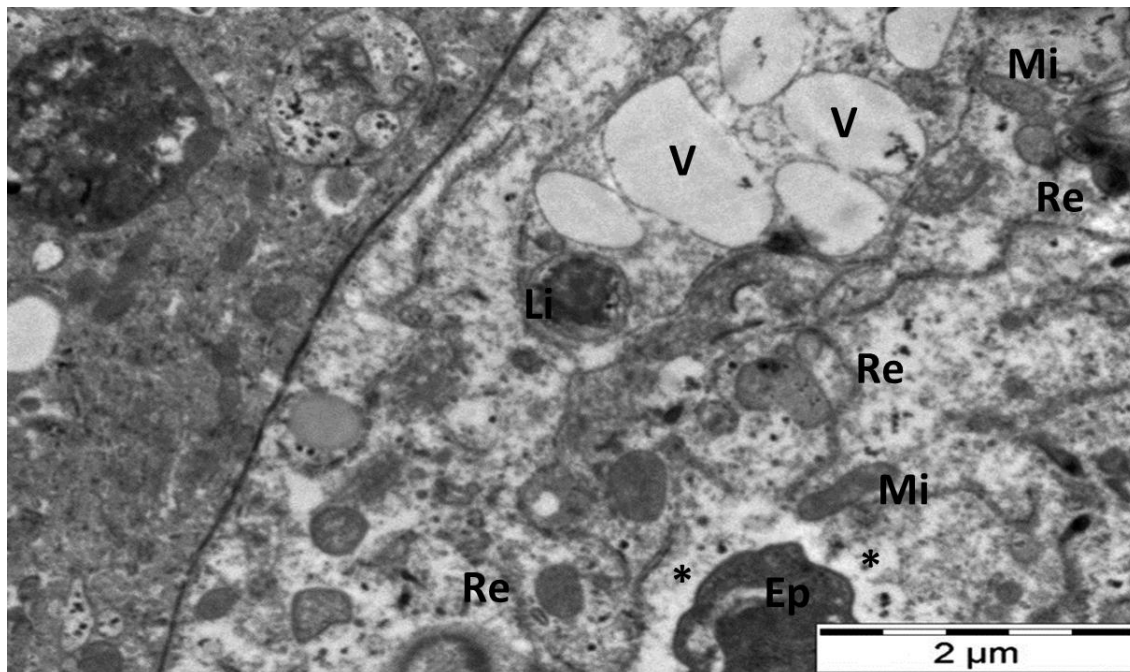
En las imágenes de microscopía óptica de los cortes semi-finos a las **36 horas** se observó en la zona distal del ventrículo, la aparición en las células epiteliales del ventrículo posibles merontes y posibles esporas primarias (figura 39). Estos resultados se apoyan con los obtenidos en los cortes utilizados para su observación en microscopía electrónica, donde se observa una marcada degeneración del citoplasma celular, de las vacuolas y desorganización de los orgánulos celulares como el retículo endoplasmático rugoso, además de mitocondrias degeneradas y lisosomas secundarios irregulares. Todo ello como consecuencia de la infección por el parásito (figura 40). En la figura 41, se observa con mayor nitidez la aparición de esporas primarias e incluso alguna germinada (espora vacía), y muchas formas intermedias que pueden corresponder con esporontes o esporoblastos.



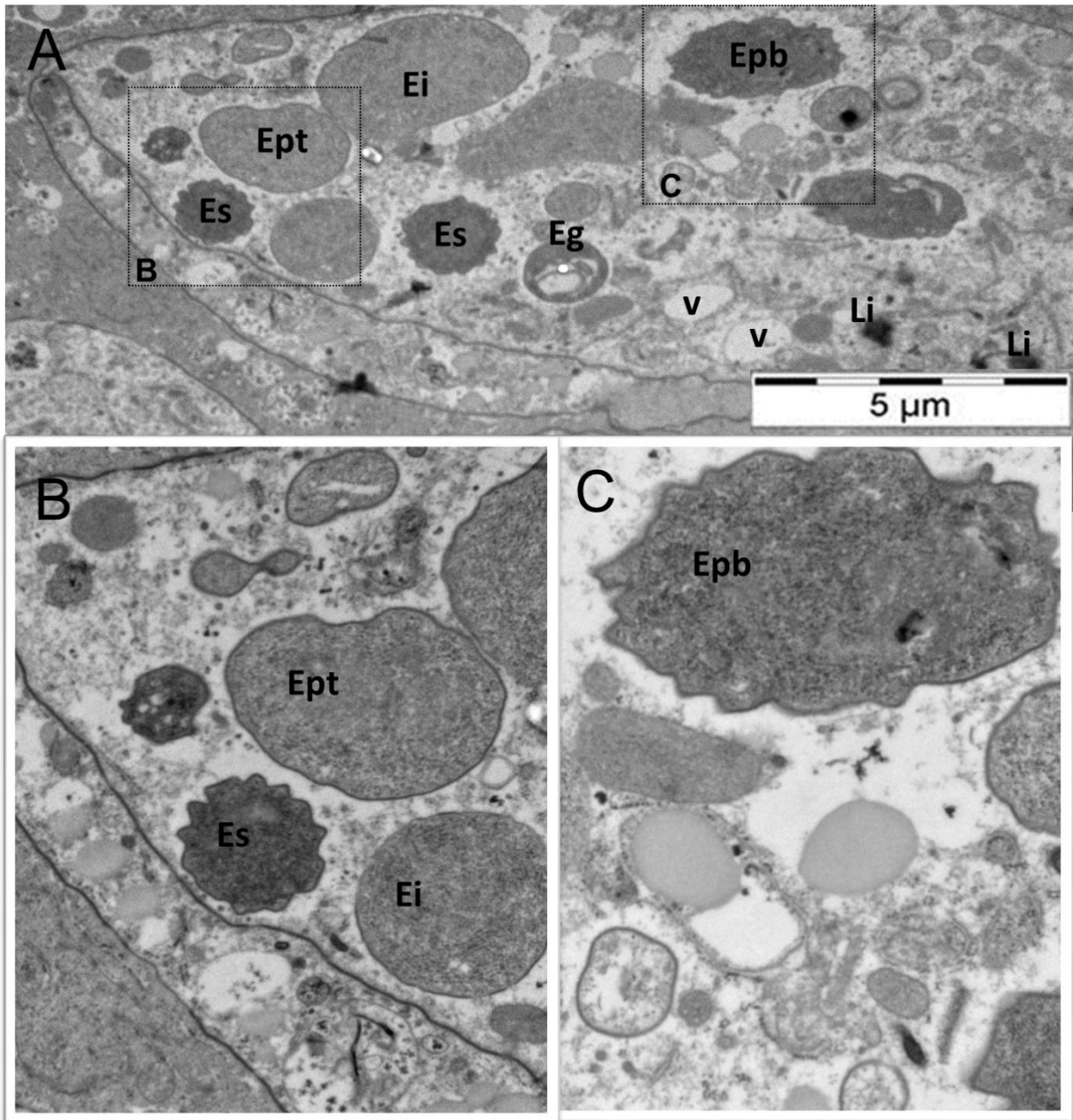
**Figura 39.** Corte semi-fino con microscopía óptica para una visión panorámica del ventrículo 36 horas post-infección. Células epiteliales con fases intermedias de la multiplicación de *N. ceranae* entre células epiteliales sanas. Tinción azul de metileno. **Me**; posibles merontes, **Ep**; posibles esporas primarias.



**Figura 40.** Detalle del citoplasma celular por microscopía electrónica a las 36 horas p.i. **Mi**: mitocondrias generadas, **V**; vacuolas, **Re**: retículo endoplasmático, **Li**; lisosomas, **Ep**; posibles esporas primarias.

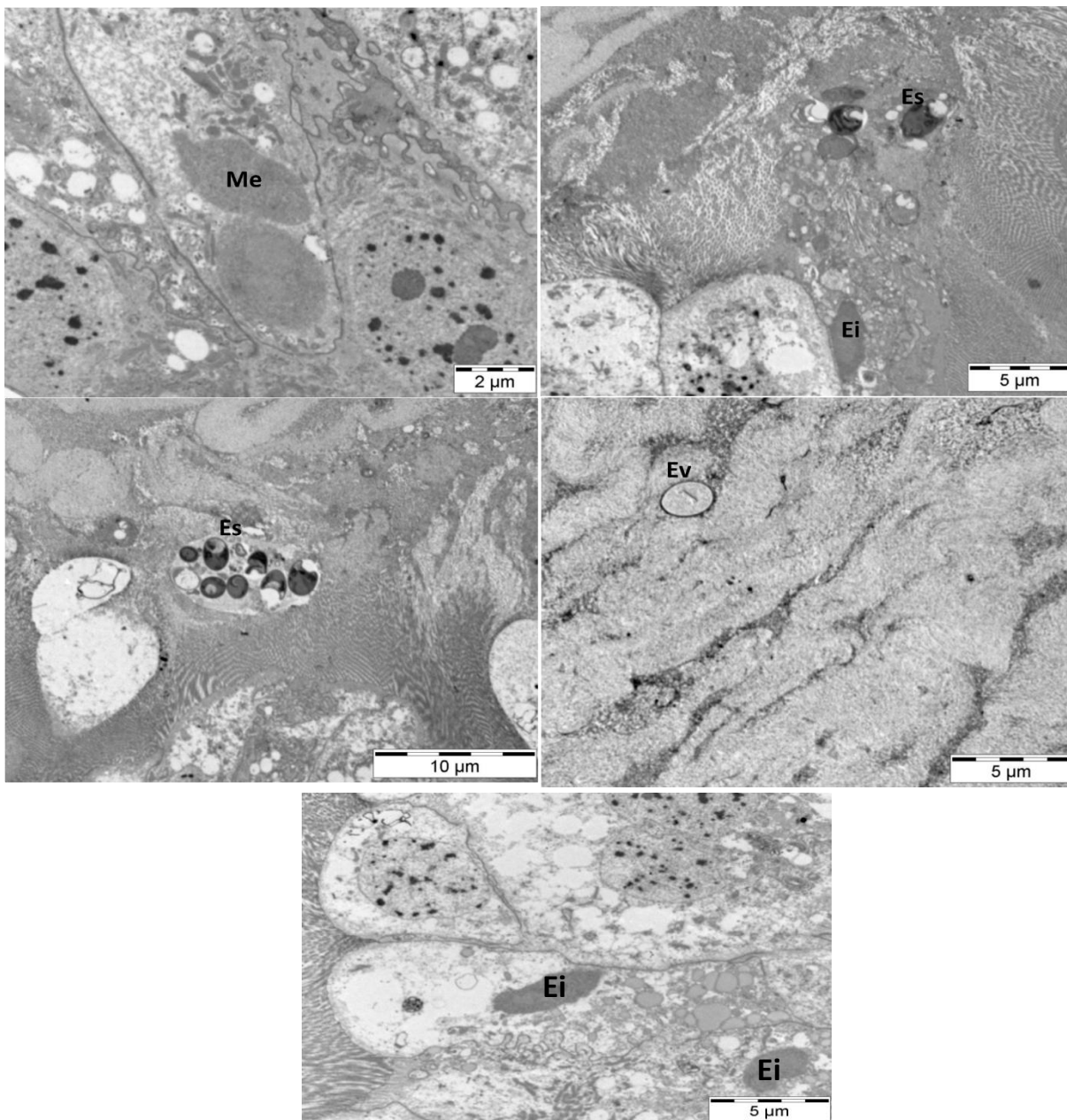


**Figura 41.** Imagen tejido ventricular por microscopía electrónica a las 36 horas post-infección. Célula del ventrículo infectado con diferentes etapas del parásito. Formas intermedias (**Ei**), esporontes (**Ept**), esporoblastos (**Epb**), esporas primarias (**Es**) y esporas germinadas (**Eg**). Marcada degeneración celular por la observación de orgánulos como vacuolas citoplasmáticas (**V**) y lisosomas (**Li**). **A** visión panorámica célula epitelial, **B** y **C** detalles de estadios intermedios y esporas primarias.



A las **48 horas** p.i., se observa un mayor número de esporas primarias, secundarias y esporas vacías. El aumento en el número de esporas vacías sugiere que el cierre del ciclo de *N. ceranae* ocurre entre las 36 y 48 horas post-infección. Además se observa una mayor cantidad de fases intermedias procedentes de la primera y de la segunda generación de esporas (figura 42).

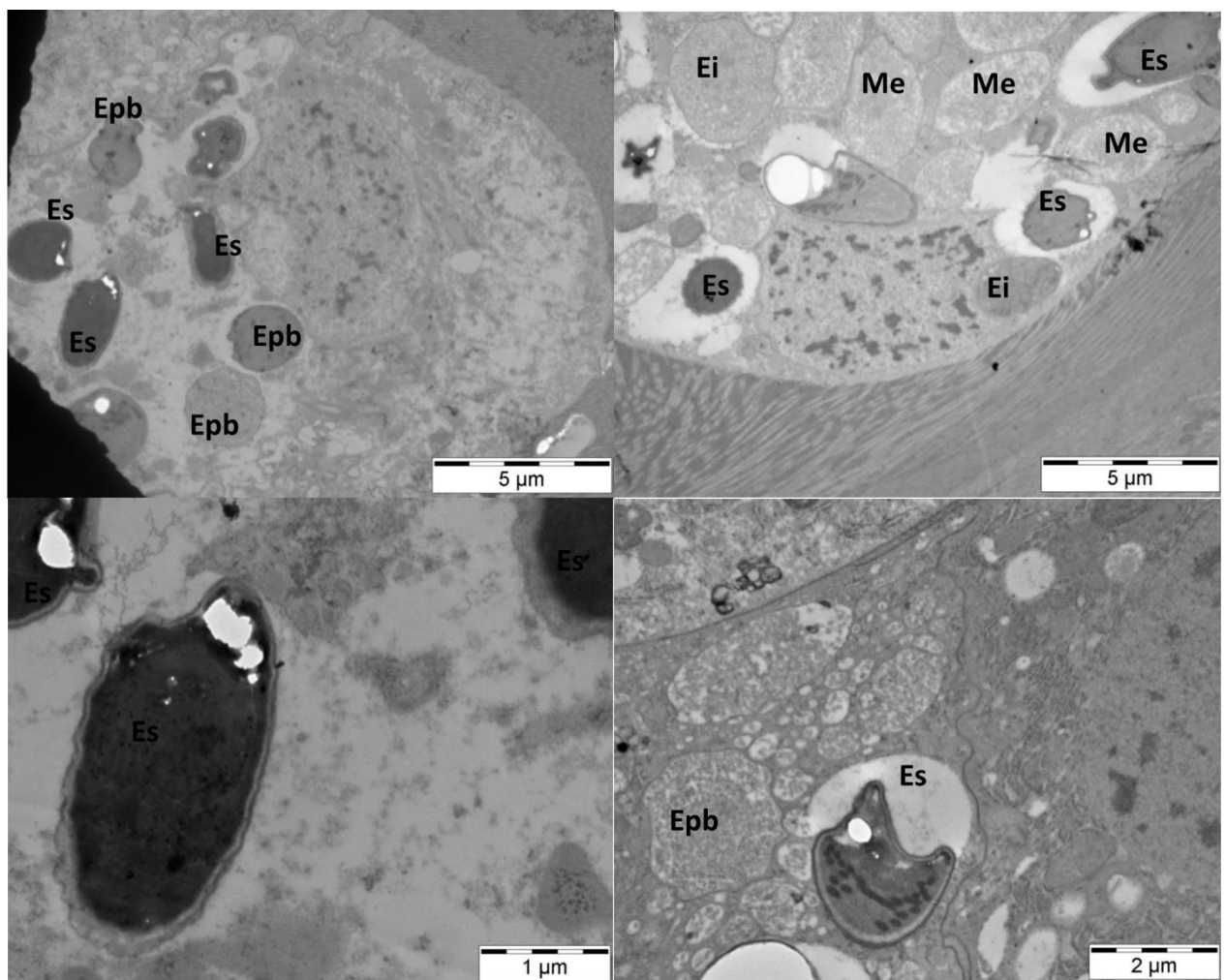
**Figura 42.** Imagen tejido ventricular por microscopía electrónica a 48 horas p.i. Esporas primarias (**Es**), esporas vacías (**Ev**) y formas intermedias (**Ei**) procedentes de la primera y segunda generación, entre ellos merontes (**Me**).





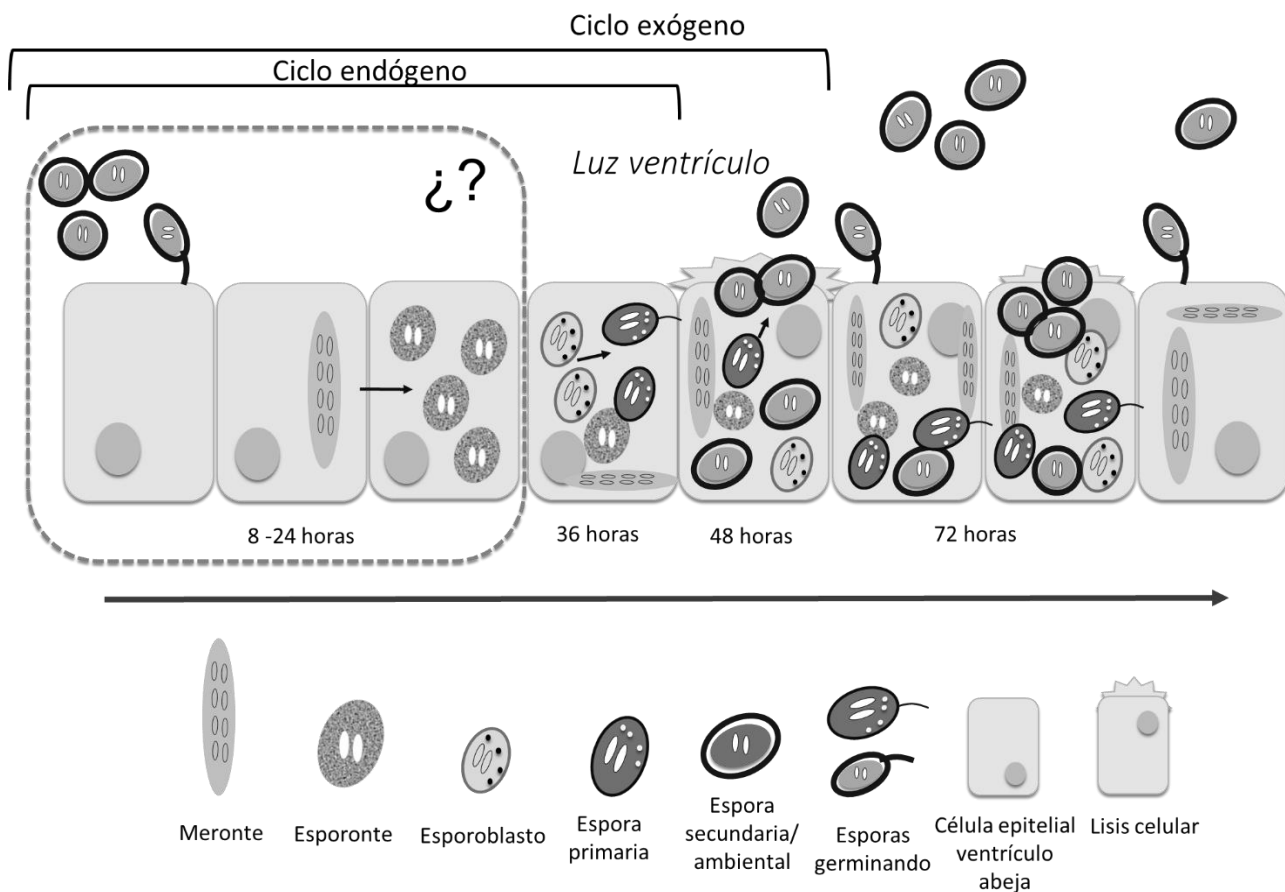
A las **72 horas** p.i., se observa una mezcla de todas las etapas del ciclo del parásito por solapamiento de las mismas dentro de la misma célula. En esta etapa se visualizan con mayor claridad los merontes y los esporoblastos, por encontrarse en mayor cantidad respecto a las imágenes de infección más tempranas. Además se observan en mayor abundancia esporas primarias y secundarias (figura 43).

**Figura 43.** Imágenes a las 72 horas p.i. Merontes (**Me**), esporoblastos (**Epb**), esporas primarias y secundarias (**Es**), estadios intermedios (**Ei**).



En la figura 44 se recoge la información obtenida durante el análisis microscópico de las imágenes y los resultados de expresión del ARNm de los genes estudiados, permitiéndonos describir el ciclo biológico de *N. ceranae* en las primeras horas de la infección.

**Figura 44. Representación del ciclo celular según los resultados obtenidos** (esquema basado en ciclo *Eimeria tenella*, Gordon y Jordan 1990).



De manera que a las 36 horas, la expresión del PTP3 coincide con la aparición de esporas primarias, sugiriendo que el cierre del ciclo endógeno y obtención de esporas de primera generación (o primarias).



## DISCUSIÓN

Este es el primer estudio que describe la infección por *N. ceranae* en sus primeras horas utilizando una técnica novedosa valorando la expresión de los genes del parásito en el interior de su hospedador a lo largo del tiempo. Se han publicado algunos trabajos en otras especies del género *Nosema spp.*, en los que el objetivo es la búsqueda de genes diana en proteínas de la pared de la espora que interaccionan con las proteínas de sus hospedadores, como es el caso descrito para *Nosema philosamiae* (Zhu y col., 2013a), donde describen qué proteínas de la pared de la espora se encargan del reconocimiento con el hospedador, o el estudio realizado con *Nosema bombycis*, donde la adherencia a la célula hospedadora disminuye mediante el bloqueo de la proteína NbHSP11 (Yang y col., 2014). En este trabajo, la selección de genes se realizó con un objetivo similar, eligiendo genes que *a priori* son fundamentales para el desarrollo del parásito, como es por ejemplo, el gen que codifica para la proteína del túbulo polar (*PTP3*) que de manera directa evitaría la formación de una estructura fundamental del parásito, y de forma indirecta el *RPB1* y *Hsp70* que participan en la replicación del parásito.

De hecho los genes *RPB1*, *Hsp70* y *PTP3* han mostrado gran relevancia en diferentes estudios. Son ampliamente utilizados como marcadores genéticos en diferentes especies de microsporidios ya que se suponen genes de copia única (Hirt y col., 1999; Xu y Weiss, 2005; Chaimanee y col., 2011; Gómez-Moracho y col., 2013). En el caso del gen de la proteína del túbulo polar es un gen muy estudiado debido a que es una proteína clave en el proceso de infección a pesar de que este gen presenta zonas variables incluso dentro del mismo aislado (Hatjina y col., 2011).

En este trabajo, la expresión del gen *PTP3* se detectó a las 36 horas después de la infección. Algunos autores indican que la síntesis del túbulo polar comienza en la fase temprana del esporoblasto durante el desarrollo primario (Takvorian and Cali, 1996). Los primeros estudios del ciclo biológico de *N. ceranae* describieron que éste se cerraba a los 3 días con la aparición de nuevas esporas en el hospedador (Higes y col., 2007a). Más tarde Gisder y colaboradores (2010) en cultivos celulares de una línea de insectos, sugirieron que la infección tiene lugar a las 16 horas post-infección, observando merontes a las 20 horas post-infección, y los primeros esporoblastos y esporas primarias a las 48-72h. Este trabajo demuestra que a las 36 horas post-infección hay presencia de esporas primarias, puesto que los análisis por microscopía electrónica lo muestran y se confirma además con los datos del análisis de expresión.

Por otro lado, los resultados obtenidos del estudio de los genes *RPB1* y *Hsp70* fueron inesperados. Inicialmente habríamos esperado que *RPB1* y *HSP70* se hubieran expresado en las primeras fases del desarrollo del microsporidio (y antes incluso de llegar a la fase de esporonte) y sin embargo no fue así. La proteína *RPB1* es una subunidad de la RNA polimerasa II, por lo que se supuso una expresión genética continua a lo largo de todo el ciclo de multiplicación del microsporidio. Lo mismo ocurre con la proteína *Hsp70*, la cual está implicada en mecanismos relacionados con la alteración del metabolismo celular (Jolly y col., 2010). Sin embargo, los resultados presentados en este trabajo muestran una expresión de *RPB1* y *Hsp70* a partir de las 48 horas post-infección, posterior al *PTP3*. El bajo nivel de expresión de *RPB1* y *Hsp70* en las fases tempranas de la infección podrían revelar que las proteínas correspondientes se expresan únicamente en la segunda generación de esporas. Esto implicaría la existencia de diferentes polimerasas con funciones específicas en cada momento del ciclo

biológico, pudiendo ser *RPB1* una de las responsables de la transcripción genética en las fases finales. En el caso de las proteínas de choque térmico, habría que realizar un nuevo estudio para establecer si esta función es exclusiva de las fases finales del ciclo de este microsporidio o si hay otras proteínas similares a *Hsp70* con función en fases tempranas. Otra posibilidad es que el nivel de expresión de estos genes sea muy inferior al del *PTP3*, y que en nuestras condiciones solo se pudieran detectar cuando estos alcanzaban un mayor nivel de concentración. Futuros estudios deberían confirmar esta posibilidad además de confirmar que todos estos genes son en realidad de copia única, y por tanto que estén los tres igual de representados en el genoma de *N. ceranae*.



## CAPÍTULO III.B)

**Control de la nosemosis mediante el silenciamiento de genes diana en *N.ceranae*. Estudio preliminar de tratamiento con ARN de interferencia.**

El ARN de doble cadena (dsRNA) es uno de los precursores del ARN de interferencia (RNAi), cuya función principal es la regulación de la síntesis proteica mediante el bloqueo o silenciamiento de genes. Este mecanismo está muy conservado en todos los filos ya que es ampliamente utilizado por la célula viva para modificar los niveles de proteínas propias o para bloquear la síntesis de proteínas ordenadas por virus u otros agentes patógenos.

Aquí se presenta un estudio preliminar para seleccionar posibles genes susceptibles de ser bloqueados por RNAi así como la dosis para su aplicación. En este apartado se identifican genes diana en *N. ceranae* que pudieran servir como candidatos para que su silenciamiento ayude a reducir la carga parasitaria en la abeja. En estudios previos han utilizado este mecanismo para el control de la nosemosis de manera indirecta a través del diseño de dsRNA que bloquea la síntesis de proteínas del hospedador imprescindibles para el desarrollo del patógeno, mostrando que el bloqueo de ciertas proteínas en la abeja evitan la multiplicación de *N. ceranae* (Li y col., 2016). La disfunción de los genes elegidos mediante la administración de dsRNA a la abeja, se podría traducir en una reducción de los niveles de infección detectados a través del recuento de esporas o de la expresión de ARNm de *N. ceranae*.



## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. SELECCIÓN DE DIANAS Y SÍNTESIS DEL ARN DE DOBLE CADENA (dsRNA)

Como en el capítulo anterior (capítulo III.A) se seleccionaron genes que previsiblemente pudiesen afectar al desarrollo de *N. ceranae*. Los genes elegidos en este caso se resumen en la tabla 12 y son los siguientes:

El **Nc83** corresponde a un gen que codifica para una proteína del túbulo polar (*PTP3*). Este gen fue seleccionado en base a los resultados obtenidos en el capítulo anterior debido a que es una proteína encargada de la invasión de la célula hospedadora. Además es uno de los genes que mostró la transcripción más temprana (36 horas p.i.). El **Nc182** corresponde a un gen que codifica para una quitina sintetasa *d* encargada de la síntesis de carbohidratos para la formación de la pared de la espora. El **Nc659** corresponde a un gen que codifica para una proteína quinasa del tipo *MAPK*, con función transductora de señales mediante fosforilación en el metabolismo celular de eucariotas. Por último el **Nc2000** corresponde a un gen que da lugar a una proteína de la pared de la espora y su función es mantener la conformidad de la estructura de la misma.

Como testigo del ensayo se utilizó el gen de la proteína fluorescente verde (*Green fluorescens protein, GFP*), proteína producida por la medusa bioluminiscente *Aequorea victoria*. Esta proteína se ha secuenciado y producido sintéticamente para su uso en biología molecular y en este ensayo se utiliza como secuencia no específica (*non-target gene*), es decir, como testigo para evaluar la acción que genera la administración de dsRNA no específico en la abeja.

El diseño de los cebadores se realizó en base a las secuencias de los genes de *N. ceranae* publicados en la base de datos *GenBank* (Cornman y col., 2019; tabla 12). En el caso de los cebadores para GFP se utilizó el vector comercial *pGFP* (Clontech; Amdam y col., 2006). Se utilizó la plataforma web *E-RNAi* (Horn, y col., 2010. [www.dkfz.de/signaling/e-rnai3/](http://www.dkfz.de/signaling/e-rnai3/)) para la síntesis de los cebadores, ya que todos ellos llevan adheridos la secuencia del promotor T7 (5'-taa tac gac tca cta tag ggc ga-3', tabla 12), secuencia necesaria para la reconocimiento durante el proceso de generación de dsRNA por la enzima encargada de la síntesis.

Una vez diseñados estos cebadores se procedió en primer lugar a la síntesis de ADN de los genes de interés mediante PCR convencional. Para ello se realizó una PCR que amplificara los fragmentos y el producto de PCR obtenido se utilizó como molde. Se usaron dos moldes, por un lado, ADN extraído de un purificado de esporas de *N. ceranae*, y por otro lado, el vector *pGFP* como testigo. La PCR fue desarrollada utilizando el *Kit TaqDNA Polymerase-Invitrogen®*, junto con los cebadores diseñados a una concentración de 20  $\mu$ M y temperatura de anillamiento de 56 °C para todas las reacciones. Una alícuota de cada producto de PCR se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Una vez verificada la amplificación, los productos de PCR sirvieron como molde para la síntesis del dsRNA mediante el *kit* comercial MEGAscript RNAi® (Ambion®). La síntesis de dsRNA se realizó

siguiendo las recomendaciones del fabricante. El dsRNA sintetizado se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se determinó su concentración mediante el espectrofotómetro (Nanodrop 8000, Thermo® Fisher Scientific Inc.). El dsRNA obtenido, para cada uno de los genes estudiados, se dispensó en las concentraciones finales de 20 ng/μl, 40 ng/μl, 60 ng/μl y 80 ng/μl preparadas en un jarabe (50% agua: azúcar). Estas soluciones se almacenaron a -80 °C hasta su administración a las abejas.

Tabla 12. Diseño de cebadores para la síntesis de dsRNA. Plataforma web E-RNAi (<http://www.dkfz.de/signaling/e-rnai3/>) detallado en Thomas Horn; Michael Boutros, Nucleic Acid Research, 2010

| Nombre | Gen / Proteína  | Función                     | Pareja de cebadores 5´- 3´                                   | Amplificación (pb) | Referencia                    |
|--------|---|-----------------------------|--|--------------------|-------------------------------|
| Nc83   | <i>Proteína del túbulo polar</i>                                    | Invasión célula hospedadora | Nc83-F; 5´-taatacgactcactatagggcgaAGAAATGGATTGGCTGATGC-3´    | 489 pb             | XM_002996713.1                |
|        |   |                             | Nc83-R; 5´-taatacgactcactatagggcgaTTCAGCCACCAAAATGTGCTA- 3´  |                    |                               |
| Nc182  | <i>Quitina sintetasa d</i>  | Formación pared espora      | Nc182-F; 5´-taatacgactcactatagggcgaTGCAACGAATAGCACCGATA- 3´  | 497 pb             | XM_002996666666.1             |
|        |   |                             | Nc182-R; 5´-taatacgactcactatagggcgaGCCGGTAAATTTACCATCTG- 3´  |                    |                               |
| Nc659  | <i>Proteína quinasa (Mitogenactivated protein kinase organizer)</i> | Regulador patogenicidad     | Nc659-F; 5´-taatacgactcactatagggcgaCGTCAGCACTGGCTGATAAA- 3´  | 488 pb             | XM_002996250.1                |
|        |   |                             | Nc659-R; 5´-taatacgactcactatagggcgaAGGACAGCCTAAATTGCACC- 3´  |                    |                               |
| Nc2000 | <i>Proteína de pared de la espora (swp25_nosbo ame)</i>             | Formación pared espora      | Nc2000-F; 5´-taatacgactcactatagggcgaGACGATTCAAGAAATGGCGT-3´  | 443 pb             | XM_002995224.1                |
|        |   |                             | Nc2000-R; 5´-taatacgactcactatagggcgaTTAAAAAGAGTCTGCTGCGA- 3´ |                    |                               |
| GFP    | <i>Proteína verde fluorescente (GFP)</i>                            | Inespecífico                | GFP-F; 5´-taatacgactcactatagggcgaTTCCATGGCCCAACACTTGTCA- 3´  | 482 pb             | pGFP (Clontech) (Amdam, 2006) |
|        |   |                             | GFP-R; 5´-taatacgactcactatagggcgaTCAAGAGGACCATGTGGTC- 3´     |                    |                               |

## 2. RECOGIDA DE ABEJAS PARA EL TRABAJO EN LABORATORIO

Este estudio se realizó en abejas procedentes de colonias de *Apis mellifera ligustica* a las que mensualmente se les hace un seguimiento y que se encuentran situadas en el colmenar experimental del centro de investigación *Bee Research Laboratory, Beltsville en Maryland, EEUU (United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service, USDA-ARS)*.

Las abejas recién nacidas se recogieron de cuadros de cría procedentes de colonias fuertes y sanas, que habían sido identificadas como negativas a *Nosema sp.* por microscopía óptica. Los cuadros de cría se depositaron individualmente en cajas porta cuadros, y se mantuvieron en estufas incubadoras a  $34 \pm 1$  °C,  $55 \pm 5\%$  HR (humedad relativa), hasta su nacimiento. Las abejas que emergieron a las 24 horas fueron las utilizadas para el ensayo. Para confirmar que las abejas de este ensayo no estaban infectadas por *Nosema sp.*, antes de proceder a la infección experimental, se tomaron 30 abdómenes de abejas recién nacidas que se maceraron en 30 ml de agua destilada. Se utilizaron 10 µl del homogenizado, y se observó con ayuda de un hemocitómetro buscando la presencia de esporas en el microscopio óptico, siguiendo el método descrito previamente (Cantwell, 1970).

## 3. OBTENCIÓN DE ESPORAS DE *N. ceranae*

Las esporas de *N. ceranae* se obtuvieron de abejas pecoreadoras recolectadas a la entrada de colmenas que previamente habían sido identificadas como positivas a *N. ceranae*, situadas en el USDA-ARS. Aproximadamente 300 ventrículos de abejas se extrajeron con pinzas mediante la metodología descrita en el capítulo III.A, y se homogeneizaron en agua destilada. La purificación de esporas se realizó como describieron Fries y colaboradores, (2013). El macerado se filtró con ayuda de una malla de nylon (con un poro de 65 µm de tamaño). El producto obtenido se centrifugó durante 5 minutos a  $3.000 \times g$ . Una vez centrifugado se descartó el sobrenadante, y el sedimento se lavó mediante su re-suspensión en agua esterilizada y posterior centrifugado durante 10 minutos a  $5.000 \times g$  (este proceso se realizó dos veces). Finalmente, se descartó el sobrenadante y se suspendió en agua estéril. Se almacenó a temperatura ambiente durante no más de una semana. El recuento de esporas se realizó en cámara Neubauer para preparar el inóculo de la infección, diluyendo las de esporas en jarabe (50% azúcar: agua) a una concentración final de  $2.0 \times 10^7$  esporas/ml.

## 4. INFECCIÓN EXPERIMENTAL

Las abejas recién nacidas se traspasaron del cuadro de cría a un recipiente sin alimento y se mantuvieron en ayuno durante 3 horas en una estufa (32°C, 75% HR). Cada infección individual se realizó con 5 µl de la solución de azúcar y un total de 100.000 esporas por abeja (obtenida con recuento en cámara Neubauer; OIE 2008). El testigo negativo fue tratado del mismo modo y se le administró 5 µl de jarabe sin esporas. Las abejas infectadas con *N. ceranae* se enjaularon inmediatamente.

5. CONDICIONES DEL ENSAYO Y TRATAMIENTO CON ARN DE DOBLE CADENA (*dsRNA*)

Cada jaula se componía de 35 abejas que inmediatamente después de la infección se les suministró a cada grupo el alimento *ad libitum* al que se había añadido el *dsRNA* de los 5 genes seleccionados para este estudio a través de una jeringa graduada. El jarabe administrado (1 ml) se renovaba cada día y se medía el consumo (Evans, 2009). Complementariamente se suministró una fuente de proteínas a través de una mezcla de polen y alimento azucarado semi-sólido, que se depositó en el fondo de la jaula.

El esquema del ensayo puede observarse en la figura 45. Para ello se dispuso de una jaula con 35 abejas por cada gen y por cada concentración de estudio; Nc83, Nc182, Nc659, Nc2000 y GFP a 20 ng/ $\mu$ l, 40 ng/ $\mu$ l, 60 ng/ $\mu$ l y 80 ng/ $\mu$ l.

En los días 5, 10 y 15, post-tratamiento se tomaron 10 abejas de cada jaula con ayuda de unas pinzas y se introdujeron en tubos individuales que se congelaban inmediatamente a -80°C (tabla 13) hasta su uso. De las 10 abejas recogidas, 5 se utilizaron para realizar en recuento de esporas al microscopio y otras 5 para el análisis de expresión de ARN. Además del grupo testigo alimentado con *dsRNA* inespecífico (GFP-*dsRNA*), hubo otros dos grupos testigo en este experimento, uno con abejas infectadas sin *dsRNA* (C+), y otro sin infectar ni *dsRNA* (C- sanas). Las jaulas se incubaron a 32 °C, 75 % HR, y las abejas muertas se contabilizaron y se eliminaron cada día.

**Figura 45.** Distribución de las jaulas según el gen analizado y la concentración de *dsRNA*. Jaulas con 35 abejas, por grupo y dosis.

| Grupo   | Dosis (ng / $\mu$ l) |     |     |     |     | Infección<br>Si/No |
|---------|----------------------|-----|-----|-----|-----|--------------------|
|         | 0                    | 20  | 40  | 60  | 80  |                    |
| GPF     | ---                  | ✓   | ✓   | ✓   | ✓   | Si                 |
| Nc 83   | ---                  | ✓   | ✓   | ✓   | ✓   | Si                 |
| Nc 183  | ---                  | ✓   | ✓   | ✓   | ✓   | Si                 |
| Nc 659  | ---                  | ✓   | ✓   | ✓   | ✓   | Si                 |
| Nc 2000 | ---                  | ✓   | ✓   | ✓   | ✓   | Si                 |
| C+      | ✓                    | --- | --- | --- | --- | Si                 |
| C-      | ✓                    | --- | --- | --- | --- | No                 |



**Tabla 13.** Representación cronológica de la metodología.

|         | Nacimiento abejas | infección experimental | Toma de muestras |
|---------|-------------------|------------------------|------------------|
| Día 0   | ✓                 | ✓                      | ---              |
| Día 5   | ---               | ---                    | ✓                |
| Día 10  | ---               | ---                    | ✓                |
| Días 15 | ---               | ---                    | ✓                |

#### 6. RECuento DE ESPORAS POR MICROSCOPIA

Las 5 abejas de cada grupo recogidas en los días 5, 10 y 15 se machacaron individualmente en 1 ml de H<sub>2</sub>O estéril y se analizaron siguiendo el método descrito por Cantwell, (1970) para determinar por microscopía óptica el número de esporas por abeja mediante su recuento en cámara Neubauer.

#### 7. EXTRACCIÓN DE ARN Y RETRO-TRANSCRIPCIÓN

De las 5 abejas restantes de cada grupo y dosis, recogidas en los días 5, 10 y 15 p.i., se tomaron 4 abdómenes (máximo 100 mg tejido, según las indicaciones del fabricante, Qiagen®) repartidos en dos tubos con perlas de cerámica (Green beads Roche®), de manera que se obtuvieron 2 réplicas de ARN por gen, concentración y punto de muestreo. La extracción del ARN total y eliminación del ADN genómico se realizó siguiendo el mismo método descrito en el capítulo III.A (extracción de ARN, pág.117) A lo largo de todo el proceso se incluyeron testigos para garantizar la ausencia de contaminación y eliminación del ADN genómico. El cDNA se almacenó a -20 °C hasta su uso.

#### 8. ANÁLISIS MOLECULAR (PCR CUANTITATIVA)

Con el fin de establecer si la administración de dsRNA produce un silenciamiento de los genes de *N.ceranae* detectables por una reducción en la expresión, se realizó una PCR cuantitativa (qPCR, LightCycler 480 Roche®). El marcaje elegido para la detección de la señal se realizó con SYBR Green. Los cebadores se diseñaron con el programa *Primer3* (Untergasser y col., 2012) en base a las secuencias anteriormente utilizadas para el diseño de los cebadores de síntesis de dsRNA (tabla 14). El aumento o disminución, en la expresión de los genes de estudio, se midió respecto a un gen de referencia para la abeja que fue la  $\beta$ -actina (Yang y Cox Foster, 2005). Además se estudió la expresión de los genes que codifican para dos péptidos antimicrobianos (AMP): Apidaecina (Simone y col., 2009) y Abaecina (Evans y col., 2006). Las qPCR se realizaron en placas multipocillo 384. Los cebadores se utilizaron a una concentración de 20  $\mu$ M, junto al kit comercial LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche®) en un volumen final de 10  $\mu$ l de reacción. La temperatura de anillamiento de todos los cebadores fue 56 °C. Se dispusieron 2 replicados por muestra, incluyendo controles en todas las etapas (testigos de extracción, retro-transcripción y PCR) para determinar la ausencia de contaminaciones. Se estableció la

calidad de la técnica y especificidad de la amplificación comprobando que las curvas de fusión en cada PCR correspondían efectivamente al producto amplificado de interés.

**Tabla 14.** Secuencia de cebadores utilizada para el estudio expresión.

| Gen             | Cebador F (5'—3')      | Cebador R (5'—3')     | Referencia               |
|-----------------|------------------------|-----------------------|--------------------------|
| qPCR-Nc83       | AGCACAAAGGAGTCGAGCAAA  | TGCTGCCTCAAATCCTACCT  | XM_002996713.1           |
| qPCR-Nc182      | GAGAACGTGGTGGTCAAACG   | ACCTTCTCTCGCCATGCATT  | XM_00299666666.1         |
| qPCR-Nc659      | GGTACTTACAGGCTGGCACA   | CACCCCAATTTTGCTGCACA  | XM_002996250.1           |
| qPCR-Nc2000     | TTGGCACGTCTGAAGGTAGT   | GAATCGTCAAGCCAGTTCACA | XM_002995224.1           |
| qPCR-GFP        | TGGTGTTCAATGCTTTTCC    | GTCTTGTAAGTCCCGTCATCT | XM_002995224.1           |
| $\beta$ -Actina | ATGCCAACACTGTCTTTCTGG  | GACCCACCAATCCATACGGA  | Yang y Cox-Foster (2005) |
| Apidaecina      | TTTTGCCTTAGCAATTCTTGTG | GTAGGTCGAGTAGGCGGATCT | Simone y col., (2009)    |
| Abaecina        | CAGCATTCGCATACGTACCA   | GACCAGGAAACGTTGGAAC   | Evans y col., (2006)     |

\*Todos los cebadores pertenecientes a los genes de estudio fueron de diseño propio para este trabajo.

## 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 9.1. Expresión de ARN

Como ya hemos comentado anteriormente, los valores de Cp de cada uno de los genes se calculó a través del algoritmo estadístico máximo de la 2ª derivada (*Second derivative Maximum*, LightCycler 480 software, Roche®). La eficiencia de los cebadores se estableció tras la realización de una curva estándar analizando una serie de diluciones decimales de una muestra de concentración conocida (extracción de ADN procedente de una solución de un número de esporas conocido). El análisis de las dinámicas de expresión de todos los genes durante el curso de infección de *N. ceranae*, y la expresión de genes de inmunidad tras tratamiento con dsRNA se realizó mediante el programa REST 2009 (Qiagen®, desarrollado por Dr. Michael W. Pfaffl), teniendo en cuenta las eficiencias de las reacciones para cada gen.

### 9.2. Recuento de esporas

Para evaluar el efecto del tratamiento con dsRNA sobre el recuento al microscopio de esporas se utilizó un análisis no paramétrico de *Kruskal-Wallis*. Además se contrastaron los grupos uno a uno respecto a los testigos mediante el análisis no paramétrico de *Mann-Whitney*. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ . Todos los análisis se procesaron mediante el paquete estadístico SPSS versión 21.0.

## RESULTADOS

### 1. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE *N. ceranae*

Se realizaron dos análisis independientes, uno tomando como referencia el testigo positivo (C+, abejas infectadas, pero sin tratar con dsRNA), y otro tomando como referencia el testigo inespecífico (GFP, abejas tratadas con dsRNA inespecífico).

Los resultados de expresión respecto al testigo positivo sin tratar (C+, tabla 15-izquierda) se observó una reducción de la expresión estadísticamente significativa en 11 puntos (principalmente en Nc83 y Nc2000), y una sobre-expresión en 7 puntos (principalmente en Nc659 y Nc2000). Sin embargo en la mayoría de los puntos no hay diferencias estadísticamente significativas.

En los resultados obtenidos respecto al testigo inespecífico (GFP, tabla 15-derecha), solo se observó una reducción de la expresión significativa en Nc83, a las dosis 40 y 80 ng/μl y en Nc2000, a las dosis 20 y 80 ng/μl. En ambos casos esa reducción se dio en momentos puntuales (días 5 y 15 para Nc83 o 5 y 10 para Nc2000,  $p < 0,05$ ). Sin embargo la mayoría de los puntos significativos corresponden a una sobre-expresión principalmente en Nc182 y Nc659.

En resumen, a pesar de las diferencias entre ambos testigos, la administración de dsRNA con Nc83 y Nc2000 tiende a reducir su expresión, al contrario que en Nc659 y Nc182.

**Tabla 15.** Expresión genes *N. ceranae* en grupos tratados respecto a testigos (C+ y GFP).

|                                      |    | Testigo C+ |        |        | Testigo GFP |        |        |
|--------------------------------------|----|------------|--------|--------|-------------|--------|--------|
| Gen / concentración                  |    | Día 5      | Día 10 | Día 15 | Día 5       | Día 10 | Día 15 |
| Nc 83 // Proteína del túbulo polar 3 | 20 |            |        | nd     |             |        | nd     |
|                                      | 40 |            |        | nd     |             |        | nd     |
|                                      | 60 |            | *      |        |             | *      | nd     |
|                                      | 80 |            |        | *      |             |        | *      |
| Nc182 // Quitina sintetasa d         | 20 |            | nd     | nd     |             | nd     | nd     |
|                                      | 40 |            |        | nd     |             |        | nd     |
|                                      | 60 |            |        | nd     |             |        | nd     |
|                                      | 80 |            | *      | nd     |             | *      | nd     |
| Nc659 // Proteína quinasa            | 20 |            | *      | nd     |             | *      | nd     |
|                                      | 40 |            |        | nd     |             |        | nd     |
|                                      | 60 |            |        |        |             |        | nd     |
|                                      | 80 |            |        |        |             |        | nd     |
| Nc2000 // Proteína pared espora      | 20 |            | *      | nd     | nd          | *      |        |
|                                      | 40 |            |        |        | nd          | nd     | nd     |
|                                      | 60 |            |        |        |             | nd     | nd     |
|                                      | 80 | *          |        |        | *           | nd     | nd     |

\* Muestras con el mismo resultado frente a un testigo o a otro.

Los puntos marcados como “sin análisis” corresponden a la falta de tejido para analizar al final del ensayo consecuencia de la muerte de las abejas, o a PCRq fallidas.



## 2. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

Además de evaluar la expresión de los genes de *N. ceranae*, se midió la reducción o aumento en la expresión de los péptidos antimicrobianos: abaecina y apidaecina. Sin embargo los resultados estadísticos de este estudio preliminar en cuanto a la evaluación de la respuesta inmune independientemente del gen evaluado, no parecen ser muy concluyentes.

Los resultados de expresión de la **abaecina**, respecto al testigo de abejas infectadas sin tratar con dsRNA (C+, tabla 16A-izquierda), muestran una tendencia a la reducir de la expresión de la abaecina en todos los días estudiados.

En cambio en el análisis de expresión de la abaecina frente al testigo de abejas tratadas con dsRNA inespecífico (GFP) se observan en general muy pocos cambios, únicamente se muestra una sobre-expresión en Nc83 y Nc659 en el día 10 y sub-expresión en 5 puntos a día 5 p.i. y post-tratamiento.

Los resultados obtenidos de la expresión de la **apidaecina** no mostró resultados muy concluyentes al compararlos con el testigo de abejas infectadas no tratadas (C+ tabla 16B, izquierda). Se observa el mismo número de puntos en los que hay sobre-expresión como sub-expresión sin mostrar relación aparente con el día o el gen. Únicamente en Nc83 a 80 ng/ $\mu$ l se mantiene sub-expresado en el día 5 y 10.

Al comparar los resultados obtenidos de apidaecina respecto al testigo de abejas tratadas con dsRNA no específico, se observa una sobre-expresión de este gen principalmente en el día 10 con Nc83 y Nc659.

**Tabla 16.** Expresión abaecina y apidaecina en grupos tratados respecto a testigos (C+ y GFP)

| <b>A</b>                             |    | <b>Testigo C+ / Abaecina</b> |        |        | <b>Testigo GFP / Abaecina</b> |        |        |
|--------------------------------------|----|------------------------------|--------|--------|-------------------------------|--------|--------|
| Gen / concentración                  |    | Día 5                        | Día 10 | Día 15 | Día 5                         | Día 10 | Día 15 |
| Nc 83 // Proteína del túbulo polar 3 | 20 |                              |        | nd     |                               |        | nd     |
|                                      | 40 |                              |        | nd     |                               |        | nd     |
|                                      | 60 |                              |        |        |                               |        | nd     |
|                                      | 80 |                              |        |        |                               |        | nd     |
| Nc182 // Quitina sintetasa d         | 20 |                              | nd     | nd     |                               | nd     | nd     |
|                                      | 40 |                              |        | nd     |                               |        | nd     |
|                                      | 60 |                              |        | nd     |                               |        | nd     |
|                                      | 80 | *                            |        | nd     | *                             |        | nd     |
| Nc659 // Proteína quinasa            | 20 | *                            |        | nd     | *                             |        | nd     |
|                                      | 40 | *                            |        | nd     | *                             |        | nd     |
|                                      | 60 |                              |        |        |                               |        | nd     |
|                                      | 80 |                              |        | nd     |                               |        | nd     |
| Nc2000 // Proteína pared espora      | 20 |                              |        | nd     | nd                            |        | nd     |
|                                      | 40 |                              |        |        | nd                            | nd     | nd     |
|                                      | 60 | *                            |        |        | *                             | nd     | nd     |
|                                      | 80 | *                            |        |        | *                             | nd     | nd     |

| <b>B</b>                             |    | <b>Testigo C+ / Apidaecina</b> |        |        | <b>Testigo GFP / Apidaecina</b> |        |        |
|--------------------------------------|----|--------------------------------|--------|--------|---------------------------------|--------|--------|
| Gen / concentración                  |    | Día 5                          | Día 10 | Día 15 | Día 5                           | Día 10 | Día 15 |
| Nc 83 // Proteína del túbulo polar 3 | 20 |                                |        | nd     |                                 |        | nd     |
|                                      | 40 |                                |        | nd     |                                 |        | nd     |
|                                      | 60 |                                | *      |        |                                 | *      | nd     |
|                                      | 80 |                                |        |        |                                 |        |        |
| Nc182 // Quitina sintetasa d         | 20 |                                | nd     | nd     |                                 | nd     | nd     |
|                                      | 40 |                                |        | nd     |                                 |        | nd     |
|                                      | 60 |                                |        | nd     |                                 |        | nd     |
|                                      | 80 |                                |        | nd     |                                 |        | nd     |
| Nc659 // Proteína quinasa            | 20 |                                |        | nd     |                                 |        | nd     |
|                                      | 40 |                                |        | nd     |                                 |        | nd     |
|                                      | 60 |                                |        |        |                                 |        | nd     |
|                                      | 80 |                                |        | nd     | *                               |        | nd     |
| Nc2000 // Proteína pared espora      | 20 |                                |        | nd     | nd                              |        | nd     |
|                                      | 40 |                                |        |        | nd                              | nd     | nd     |
|                                      | 60 |                                |        |        |                                 | nd     | nd     |
|                                      | 80 |                                |        |        |                                 | nd     | nd     |

Sub-expresión
  Sobre-expresión
 

nd

 Sin análisis
  Sin diferencias estadísticas

\* Muestras con el mismo resultado frente a un testigo o a otro.

Los puntos marcados como “sin análisis” corresponden a la falta de tejido para analizar al final del ensayo consecuencia de la muerte de las abejas, o a PCRq fallidas.

3. EVALUACIÓN DEL RECuento DEL NÚMERO DE ESPORAS

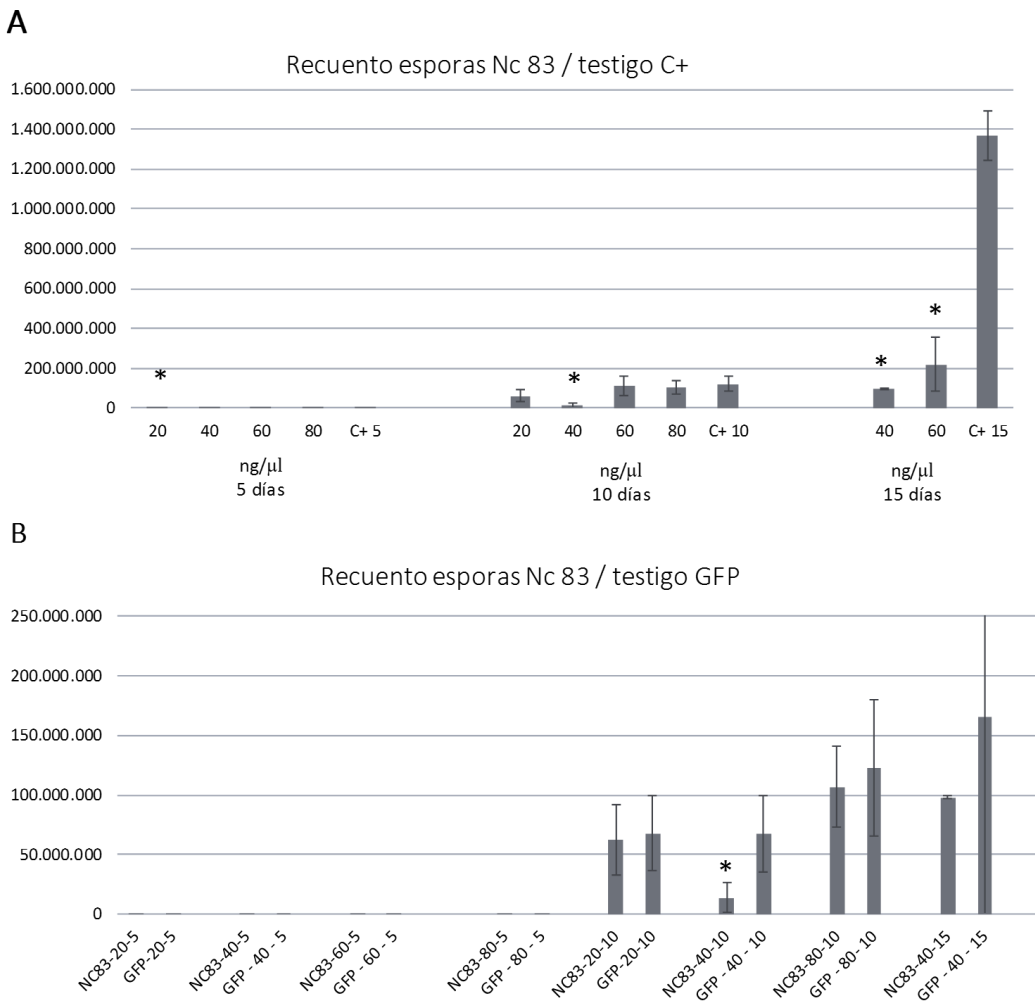
Se observó una tendencia al aumento del número de esporas de *N. ceranae* en los grupos tratados y los testigos (C+ o GFP). No obstante, el aumento más acusado fue en el testigo C+ con un número de esporas mayor a  $10^9$ , un orden de magnitud superior al resto de jaulas tratadas con dsRNA.

Para el siguiente estudio se realizó un análisis estadístico no paramétrico debido al bajo número de datos ( $n < 30$ ) frente a los distintos testigos (GFP y C+). Ambos análisis mostraron diferencias estadísticamente significativas que se detallan a continuación en cada caso (*Kruskal-Wallis*  $p < 0,05$ ).

Los resultados obtenidos del recuento de esporas después del tratamiento con **Nc83** respecto al testigo no tratado (C+) mostró una reducción en el número de esporas estadísticamente significativas en 20 ng/ $\mu$ l a día 5, en 40 ng/ $\mu$ l a día 10, y en 40 y 60 ng/ $\mu$ l a día 15 ( $p < 0,05$ ). En este último punto de muestreo las diferencias se observan con claridad en la figura 46A.

Sin embargo el recuento de esporas respecto al testigo tratado con dsRNA inespecífico (GFP) únicamente mostró diferencias estadísticamente significativas en Nc83 40 ng/ $\mu$ l en el día 10 (figura 46B). Esta reducción en el número de esporas coincide con el observado en el testigo C+.

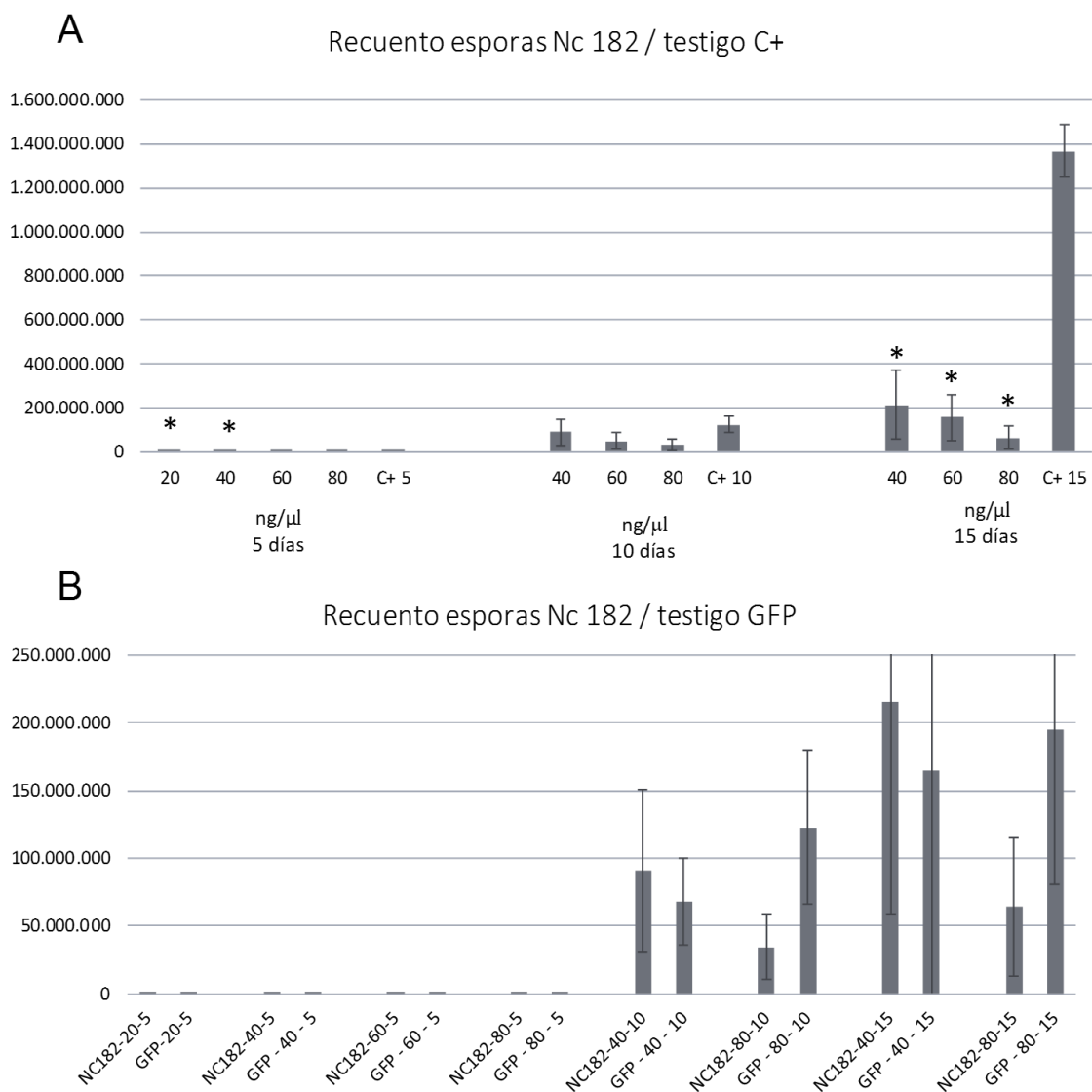
**Figura 46.** Recuento de esporas en abejas tratadas con Nc83 respecto a los testigos C+ y GFP



Los resultados obtenidos del recuento de esporas después del tratamiento con **Nc182** respecto al testigo no tratado (C+) mostró una reducción en el número de esporas estadísticamente significativas en 20 y 40 ng/μl a día 5 y en 40, 60 y 80 ng/μl a día 15 ( $p < 0,05$ ). En este último punto de muestreo las diferencias se observan en la figura 47A.

En cambio el recuento de esporas respecto al testigo tratado con dsRNA inespecífico (GFP) no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) a pesar de que en Nc182 80 ng/μl en el día 10 y 15 la reducción representada en la figura 47B es evidente. Esto se debe a la desviación típica, ya que la variabilidad en el recuento de esporas de cada abeja en estos puntos es muy elevada.

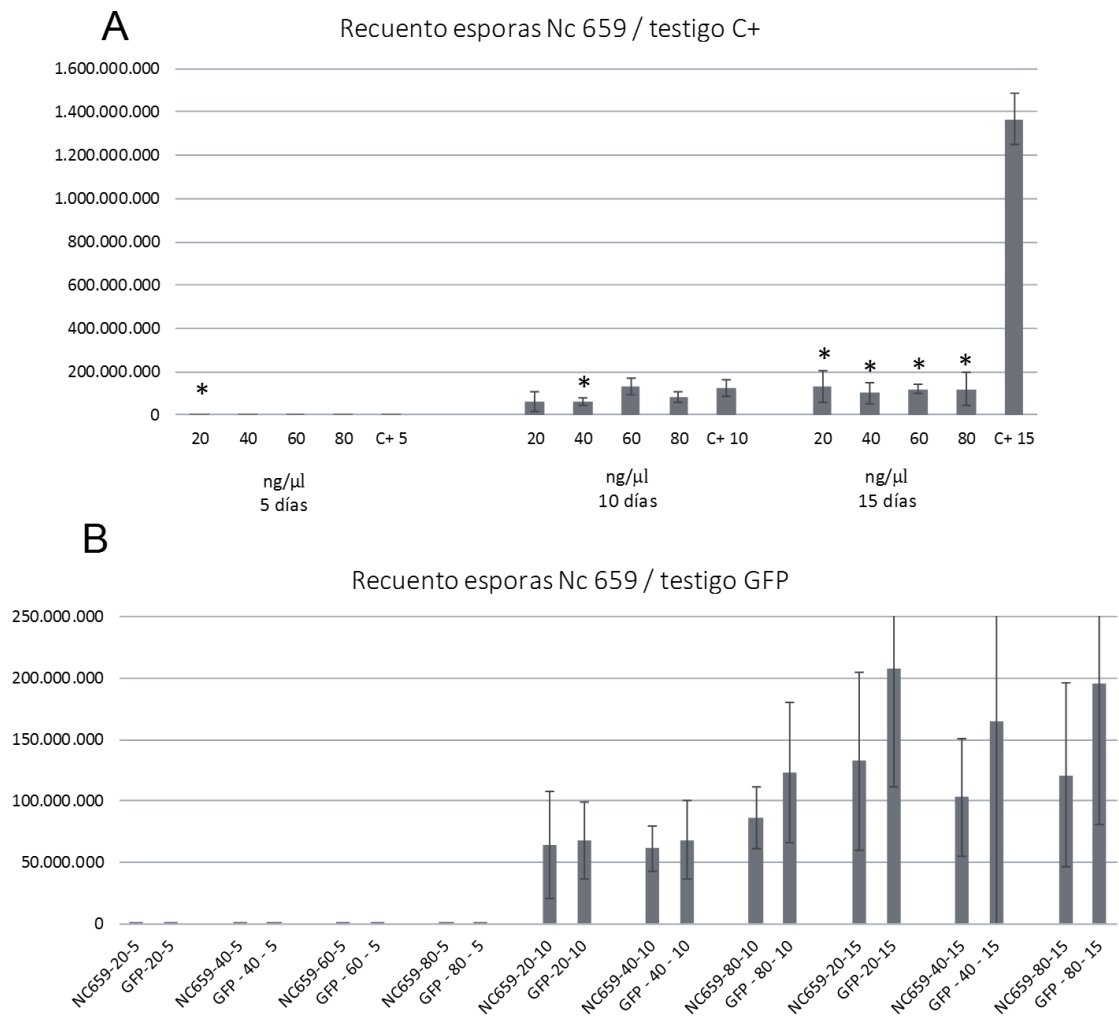
**Figura 47.** Recuento de esporas en abejas tratadas con Nc182 respecto a los testigos C+ y GFP



Los recuentos de esporas después del tratamiento con **Nc659** respecto al testigo no tratado (C+) mostró una reducción en el número de esporas estadísticamente significativas en 20 ng/ $\mu$ l a día 5 y en 40 ng/ $\mu$ l a día 10 y en todos a día 15 ( $p < 0,05$ ). En este último punto de muestreo las diferencias se observan con claridad en la figura 48A.

En cambio el recuento de esporas respecto al testigo tratado con dsRNA inespecífico (GFP) no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) a pesar de las diferencias mostradas en varios puntos representada en la figura 48B. Igual que en otros grupos esto es debido a la desviación típica.

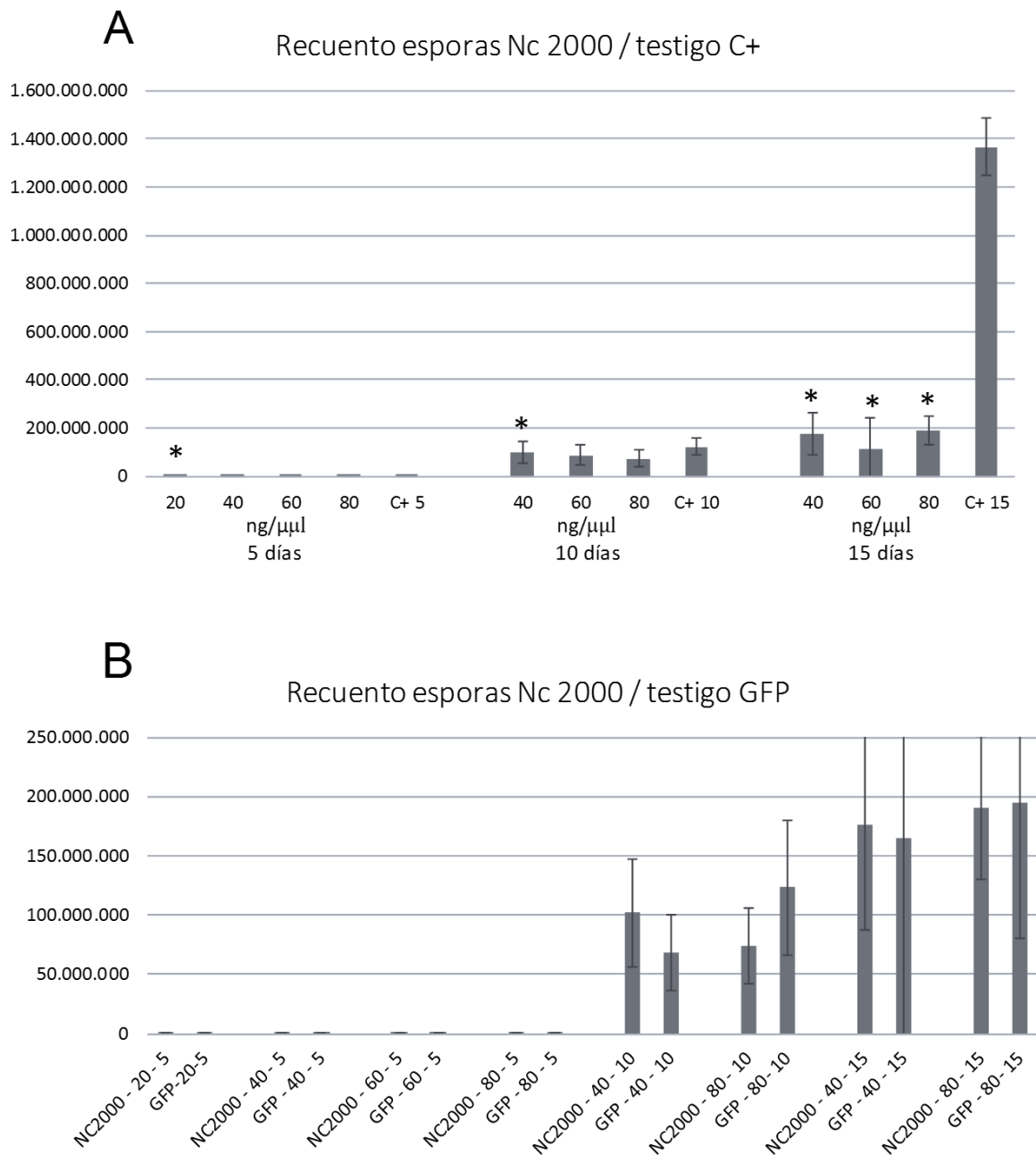
**Figura 48.** Recuento de esporas en abejas tratadas con Nc659 respecto a los testigos C+ y GFP



Los resultados obtenidos de los recuentos de esporas después del tratamiento con **Nc2000** respecto al testigo no tratado (C+) mostró una reducción en el número de esporas estadísticamente significativas en 20 ng/μl a día 5 y en 40 ng/μl a día 10 y en 40, 60 y 80 ng/μl a día 15 ( $p < 0,05$ ). A día 15 las diferencias se observan con claridad en la figura 49A.

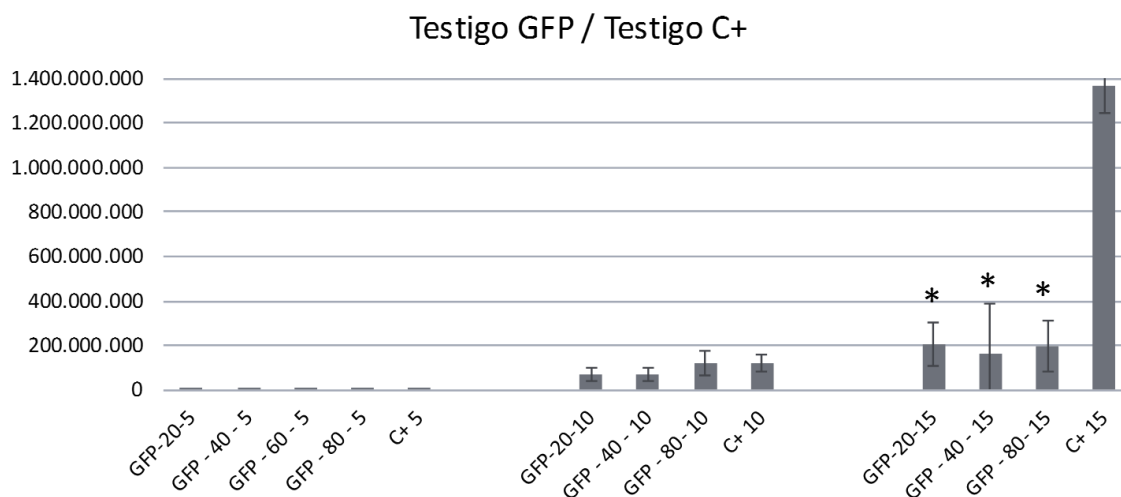
En cambio el recuento de esporas respecto al testigo tratado con dsRNA inespecífico (GFP) no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ , figura 49B).

**Figura 49.** Recuento de esporas en abejas tratadas con Nc2000 respecto a los testigos C+ y GFP.



Por último las diferencias se observan incluso al comparar los dos **grupos testigos**, de forma que el grupo tratado con GFP se vio una reducción significativa ( $p < 0,05$ , figura 50) respecto al testigo que al que no se le administró dsRNA. Por ello se deduce que las abejas que han sido tratadas con dsRNA, siempre muestran menor carga parasitaria que las que no se trataron.

**Figura 50.** Recuento de esporas en los testigos C+ y GFP.



Resumiendo, al comparar el recuento de esporas respecto al testigo C+ (abejas infectadas sin tratar con dsRNA) se observó una reducción general en el número de esporas principalmente a día 15, independientemente de la dosis y dsRNA administrado. Respecto al testigo tratado con dsRNA inespecífico (abejas infectadas y tratadas con GFP) el efecto no fue tan marcado y solo hubo diferencias estadísticamente significativas en el recuento con Nc83-40-10 ( $p = 0,016$ ). Sin embargo todos los grupos que fueron alimentados con cualquier dsRNA (específico o no) mostraron una reducción significativa del número de esporas a día 15 ( $p < 0,05$ ), respecto al testigo al que no se le administró tratamiento.



## DISCUSIÓN

En el trabajo presentado se analiza la expresión de varios genes de *N. ceranae* respecto a dos testigos; un testigo infectado y tratado con dsRNA no específico (dsRNA-GFP) y un testigo infectado y no tratado (C+). La administración de este tratamiento redujo significativamente en número de esporas de *N. ceranae* observado con el recuento en el microscopio óptico. Los continuos progresos en el estudio de RNAi muestran la capacidad de esta técnica como estrategia terapéutica en el control de enfermedades en abejas (Garbian y col., 2012; Niu y col., 2014; Li y col., 2016). Estudios previos han demostrado que el silenciamiento de genes del parásito mediante la manipulación de sus genes con RNAi suprime de manera eficiente el desarrollo del patógeno en condiciones de laboratorio (Paldi y col., 2010). *Nosema ceranae* es un parásito intracelular obligado que necesita los recursos de la célula hospedadora para completar las distintas fases de su ciclo biológico (Fries, 2010; Holt y Grozinger, 2016). En este estudio se ha evaluado si el silenciamiento de genes que codifican para proteínas imprescindibles para *N. ceranae* produce un efecto de bloqueo en la multiplicación del parásito.

Según los datos obtenidos en el capítulo anterior de búsqueda de dianas mediante el análisis de expresión, la proteína del túbulo polar (PTP3) fue la primera en detectarse, de manera que en este trabajo se optó por seguir trabajando con este mismo gen. Además se seleccionaron otros genes que previsiblemente pudiesen afectar al desarrollo de *N. ceranae* como proteínas estructurales de formación de la pared de la espora, proteínas estructurales importantes para la integridad de la espora y proteínas reguladoras. Paldi y colaboradores, (2010) consiguieron eficazmente disminuir la carga parasitaria de abejas infectadas con *N. ceranae* tras el silenciamiento de una proteína transportadora de ATP/ADP del microsporidio. Li y colaboradores, (2016) estudiaron la interacción *N. ceranae*/abeja mediante la supresión del gen *nkd* (*naked cuticle gen*) de la abeja, encargada de la modulación de la cascada de señales generada en la respuesta inmune y que además *N. ceranae* utiliza en la supresión de la respuesta inmune de la abeja después de la infección.

Al contrario que en Li y colaboradores (2016), que analizan los resultados de expresión únicamente frente al testigo no específico (dsRNA-GFP), se decidió añadir en este trabajo un testigo infectado no tratado (C+). Esta decisión se debió a la controversia observada en varios estudios donde sugieren que la alimentación con dsRNA foráneo (*non-target*), en concreto con GFP, provoca la activación de la respuesta inmune innata de la abeja (Chen y col., 2012; Flenniken y col., 2013) y que además podría deberse a la similitud que algunos genes de abeja tienen con el GFP (Nunes y col., 2013; Grozinger y col., 2015). Algunos estudios con otros organismos incluyendo células humanas, han demostrado que la alimentación con este tipo de dsRNA ayuda a prevenir la infección de patógenos, al mantener en alerta al sistema inmune (Lundgren y col., 2013). De manera que, como por el momento no existe forma de evaluar la eficacia de la administración de dsRNA sin que esta repercuta de manera indirecta en otras vías metabólicas, se decidió comparar también los resultados con un testigo de abejas infectadas pero no tratadas.

Los resultados obtenidos en este trabajo son parte de un análisis preliminar, que debe ser analizado con cautela, ya que los datos obtenidos del análisis de expresión son muy heterogéneos siendo totalmente independientes de la dosis y del gen silenciado. Sin embargo, sí se observan diferencias en los resultados dependiendo del testigo con el que se enfrenten. En el caso del testigo infectado sin tratar (C+) sí sugiere de forma general el efecto esperado que es la supresión de los genes analizados, aunque



independiente de la dosis y del gen. Frente al testigo de abejas infectadas y tratadas con dsRNA no específico (dsRNA-GFP) se observó una mayor expresión de los genes de estudio en las abejas tratadas con dsRNA específico que en las abejas alimentadas con dsRNA no específico. Estos resultados no son comparables a los obtenidos por Paldi y colaboradores (2010), ya que las condiciones en las que se desarrolló el ensayo (genes, concentraciones, infección, días de muestreo) no son idénticas, incluidos los controles utilizados. No obstante ellos sí observaron una disminución del número de esporas y de la expresión de transcrito en las abejas alimentadas con dsRNA del gen que codifica para el transportador ADP/ATP de *N. ceranae* con el que trabajan, de forma similar ocurre en los resultados aquí presentados con el recuento de esporas de todos los genes trabajados. Hay que tener en cuenta que en comparación con los resultados de eficacia obtenidos en virus (Maori y col., 2009; Liu y col., 2010; Desai y col., 2012; Chen y col., 2014; Grozinger y col., 2015), *N. ceranae* utiliza los recursos de la célula hospedadora pero siempre se encuentra rodeada de su membrana plasmática, de forma que el acceso del dsRNA al interior de *Nosema* siempre será más complicado que en el caso de un virus, que se replican en el mismo citoplasma del hospedador. Esto apoya los resultados obtenidos por Li y colaboradores, (2016) que silencian de manera más eficaz un gen de la abeja, de forma que el dsRNA solo tiene que atravesar la membrana de la célula epitelial del ventrículo. Esto podría ser el motivo de que en este ensayo no se observe una clara disminución en la expresión de los genes analizados en abejas alimentadas con dsRNA.

Por otro lado, estudios previos han revelado que la infección por *N. ceranae* afecta al sistema inmune de las abejas, esto se ve reflejado en la supresión de péptidos encargados de la inmunidad como *Apidaecina*, *Abaecina*, *Defensina* y la *Himenoptaecina* (Antúnez y col., 2009; Chamaínee y col., 2012). No obstante, muchos factores pueden influir en la respuesta inmune, como la dosis de la infección (que es muy variable entre estudios), la duración de los ensayos, los tejidos en los que se estudia la expresión génica (toda la abeja, abdomen, ventrículo, etc.), o la edad de las abejas en el momento de la infección o durante el ensayo (Chaimanee y col., 2014; Di Pasqueale y col., 2013). De manera que los resultados obtenidos, respecto a la reacción del sistema inmune después de la infección por un microsporidio, son muy heterogéneos. El bloqueo de diversos genes de *N. ceranae* y la inhibición de su desarrollo debería verse reflejado en una sobre-expresión de los péptidos inmunitarios de la abeja, como reacción normal a la infección por un patógeno tal como sugieren Li y colaboradores, (2016). Como se ha comentado anteriormente, en su trabajo bloquean una proteína reguladora de la respuesta inmune en la abeja, proteína que se sobre expresa como consecuencia de la infección por *N. ceranae* y cuya función es la supresión la respuesta inmune de la abeja. Por ello sugieren que su silenciamiento génico ayuda a revertir la supresión inmune generada por *N. ceranae*. En cambio, en el trabajo aquí presentado a pesar de utilizar dsRNA específico de *N. ceranae*, se obtienen resultados opuestos observándose una marcada supresión del sistema inmune en abejas infectadas por *N. ceranae* y tratadas con dsRNA, respecto a abejas infectadas pero no tratadas (testigo C+). Es decir la supresión es en general mayor en las tratadas que en las abejas no tratadas. Estos resultados sugieren que la administración de dsRNA desencadena en una reacción no homogénea en el sistema inmune de la abeja a lo largo del tiempo y además no es dependiente de la dosis ni del gen de estudio (Schwartz y Evans, 2013; Nunes y col., 2013; Niu y col., 2014). De manera que *N. ceranae* sigue su ciclo normal de supresión del sistema inmune cuando infecta a la célula hospedadora (Antúnez y col., 2012). Sin embargo, es posible que los genes elegidos en este trabajo no tengan relación directa con la cascada de señalización inmunitaria y por ello no se observó el efecto esperado.

Con los resultados obtenidos de la expresión de péptidos involucrados en la respuesta inmune no se pueden sacar resultados concluyentes, ni en la abaecina ni para la apidaecina. Únicamente en el

caso de la abaecina, y en rasgos generales, se observa que las abejas tratadas respecto al testigo sin tratar (C+), la abaecina está en general sub-expresada.

Al comparar la expresión de ambos péptidos antimicrobianos en los grupos tratados frente al testigo tratado con dsRNA no específico (GFP) están en general, sobre-expresados. Es decir, las abejas tratadas con dsRNA inespecífico tienen aún más suprimida su inmunidad que las tratadas con dsRNA específico, sugiriendo una leve eficacia del tratamiento con dsRNA específico, aumentando la respuesta inmune y anulando la inhibición del sistema inmune generado por el microsporidio. Sin embargo estos resultados no son comparables a los obtenidos por Brutscher y colaboradores, (2015) donde sugieren que la alimentación con dsRNA inespecífico aumenta la respuesta la inmune de la abeja.

No obstante esta variación de la expresión de genes de inmunidad a lo largo del tiempo y de la dosis de dsRNA si apoya los resultados obtenidos por Schwarz y Evans (2013), donde sugieren que la respuesta inmune de las abejas es dinámica en el tiempo, y que las infecciones por patógenos ayudan a esta alteración local de la transcripción de los genes de inmunidad.

Los resultados heterogéneos obtenidos del análisis de expresión se alejan mucho de los obtenidos en el recuento de esporas, donde si se observan resultados concordantes a la hipótesis inicial. Se observó una reducción significativa del número de esporas en todos los grupos alimentados con dsRNA específico de *N. ceranae*, respecto al testigo infectado-no tratado (C+). Al comparar los resultados frente al testigo alimentado con dsRNA-GFP, no se detectaron diferencias significativas. No obstante comparando con este último testigo, al día 15 p.i. se observó una tendencia a la disminución del número de esporas en las abejas tratadas con dsRNA específico (Li y col., 2016). Además al comparar ambos testigos, las abejas alimentadas con dsRNA presentaron menos esporas que el testigo sin tratar. Estos datos apoyan los resultados obtenidos en otros estudios donde sugieren que la administración de dsRNA inespecífico activa la defensa antiviral de la abeja (Chen y col., 2012; Flenniken y col., 2013; Nunes y col., 2013; Brutscher y col., 2015; Grozinger y col., 2015), incluso produciendo beneficios para el control de enfermedades víricas (Paldi y col., 2010). Otros autores (Judge y col., 2005) sugieren que puede ser perjudicial, ya que en seres humanos se produce una disminución en la cantidad de células del sistema inmune, mencionando además que se conoce poco de cómo afecta este tipo de tratamiento a largo plazo en el bienestar del organismo. Esto mismo vieron en abejas Jarosch y Moritz, (2011), quienes sugieren que el uso de RNAi como tratamiento requiere estrictos controles y un minucioso cuidado de las secuencias de dsRNA utilizadas, ya que éstas podrían interferir en genes no diana.

En conclusión, la administración de dsRNA a las abejas disminuyó el número de esporas significativamente independientemente de su especificidad, sin embargo el análisis de expresión de los genes silenciados no son consistentes, al igual que el de los péptidos de inmunidad. Futuros estudios deben ir encaminados al análisis en profundidad de la expresión génica de la abeja y de *N. ceranae*, en abejas infectadas y tratadas con estos dsRNA para confirmar definitivamente su uso como genes diana.



# CONCLUSIONES







## CONCLUSIONES

### **Primera:**

El estudio de sustancias para el control higiénico sanitario de las esporas de *N. ceranae*, puede realizarse con una nueva metodología específica para microsporidios, adaptada de un protocolo de desinfección de superficies de la farmacopea europea y las normas UNE, aplicable para la evaluación de sustancias de desinfección frente a otros organismos medioambientales de índole agrícola o ganadera.

### **Segunda:**

La desinfección del materia apícola para inactivar las esporas de *N. ceranae* puede realizarse con sustancias de uso común como la lejía y el amoníaco (ambos utilizados la concentración recomendada por el fabricante). Un efecto similar lo realiza la solución comercial de Mycoplasma OFF™, mostrando una alta eficacia esporicida. En el caso del ácido acético, no se observó un aumento significativo en la mortalidad de las esporas aunque sí se valoró el aumento de restos celulares, debido probablemente a la destrucción de esporas en fragmentos, lo que confirma su capacidad esporicida.

### **Tercera:**

El ácido tánico, el resveratrol, el carvacrol, el toltrazuril y el ácido oxálico no resultaron tóxicos para las abejas a las concentraciones marcadas por la norma nº 213 de la OECD. Tan solo el ácido tánico, el resveratrol y el toltrazuril fueron ingeridos voluntariamente por las abejas a la concentración máxima. La ingestión de las harinas de *Brassica nigra* se mejoró al administrarlas en un alimento semi-sólido suplementado, no resultando tóxico a las concentraciones administradas a las abejas. Sólo el ácido tánico en ensayos de laboratorio mostró una eficacia comparable a la fumagilina disminuyendo el porcentaje de parasitación de abejas infectadas con esporas de *N. ceranae*.

### **Cuarta:**

Un tratamiento durante el otoño es suficiente para controlar la parasitación por *N. ceranae*. La fumagilina sigue siendo el tratamiento por excelencia, sin embargo el resveratrol, el ácido tánico y el toltrazuril permiten mantener baja la parasitación de tal forma que las colonias llegan en las mejores condiciones a la primavera, no siendo necesario un segundo tratamiento. Los resultados del ácido tánico en campo indican la necesidad de conseguir que las abejas ingieran todo el producto, tal y como se consiguió en el laboratorio.

### **Quinta:**

Durante la búsqueda de genes diana mediante el análisis de expresión génica de *N. ceranae* en la célula hospedadora, se ha encontrado que la expresión del gen *PTP3* se detecta a las 36 horas después de la infección, observándose en ese tiempo esporas de primera generación en microscopía electrónica, por lo que se propone como posible diana terapéutica en el control de *N. ceranae*. Este gen codifica para una proteína del túbulo polar, estructura imprescindible para la inyección del contenido de la espora en el interior de la célula hospedadora.

**Sexta:**

La administración de dsRNA a las abejas disminuye significativamente el porcentaje de parasitación por *N. ceranae*, independientemente de que el dsRNA sea específico o no, tal y como se demostró en el recuento de esporas por microscopía. Por el momento, el análisis de expresión de los péptidos de inmunidad o de los genes silenciados no son consistentes, de manera que se recomienda no utilizarlo de forma conclusiva para valorar la respuesta de la abeja o del microsporidio al tratamiento, dada la falta de repetitividad de los resultados obtenidos.

# RESUMEN









## RESUMEN

La muerte de las colonias es un mecanismo multifactorial dentro del cual participan los patógenos de las abejas, como *Nosema ceranae*. Este microsporidio ha demostrado su acción patógena mediante la disminución de la productividad y viabilidad de las colonias a las que infecta, llegando incluso a producir su muerte.

En el presente trabajo se analizan distintas estrategias para el control de la nosemosis. La primera de ellas se basa en el desarrollo de medidas profilácticas para lo cual fue necesaria la puesta a punto de una metodología que evalúa la capacidad esporicida de varios productos para su uso en la limpieza del material apícola. Mediante la metodología desarrollada se evaluó positivamente la eficacia de varios productos de uso doméstico como el amoníaco, lejía y ácido acético para la desinfección del material apícola, eliminando las esporas de *N. ceranae*. Otros productos comerciales como el Mycoplasma OFF™ también surten el mismo efecto. Las técnicas profilácticas deben formar parte del control integral de enfermedades ya que evitan la entrada y difusión del patógeno de manera antropogénica, disminuyendo el riesgo de infección en individuos sanos.

La reducida disponibilidad de medicamentos eficaces para el control de la nosemosis, determina la necesidad de buscar nuevos compuestos que ayuden a controlar y mejorar el estado sanitario de las colonias infectadas. En este trabajo varios compuestos, principalmente de origen natural, han mostrado ser eficaces en condiciones de laboratorio y de campo. El ácido tánico mostró resultados comparables a los de la fumagilina en condiciones de laboratorio. En condiciones de campo, un único tratamiento en otoño con resveratrol, toltrazuril o ácido tánico, en colonias de abejas infectadas naturalmente con *N. ceranae*, fue suficiente para mantener baja la parasitación durante el invierno. De esta forma, se consigue que las colonias tratadas con estos compuestos comiencen la primavera en mejores condiciones sanitarias que aquellas que no fueron tratadas.

Durante la búsqueda de genes diana como alternativa metafiláctica y terapéutica de base molecular, se realizó un seguimiento mediante microscopía electrónica de la infección por el microsporidio, mostrando que el ciclo de *N. ceranae* se completa a las 36 horas post- infección. Esto se debe a la generación de esporas primarias en las células del ventrículo de la abeja en este tiempo. La búsqueda de dianas terapéuticas se realizó mediante el análisis de expresión génica de *N. ceranae* en las primeras fases de infección. La detección precoz del gen de la proteína del túbulo polar a las 36 horas post-infección lo marcó como posible diana terapéutica. Además del gen *PTP*, otros genes fueron seleccionados para el diseño de un tratamiento basado en la técnica del RNAi, la cual ha demostrado en otros organismos que ayuda a disminuir la replicación y el desarrollo del patógeno. En este trabajo, el tratamiento con dsRNA de los genes seleccionados, ayudó a disminuir significativamente el recuento de esporas de *N. ceranae* en las abejas que fueron tratadas.



# SUMMARY







## SUMMARY

The death of the honey bee colonies is a multifactorial mechanism in which pathogens, such as *N. ceranae*, are participating. This microsporidium has demonstrated to have pathogenic action because it reduces the productivity and viability of the colonies it infects, even killing them.

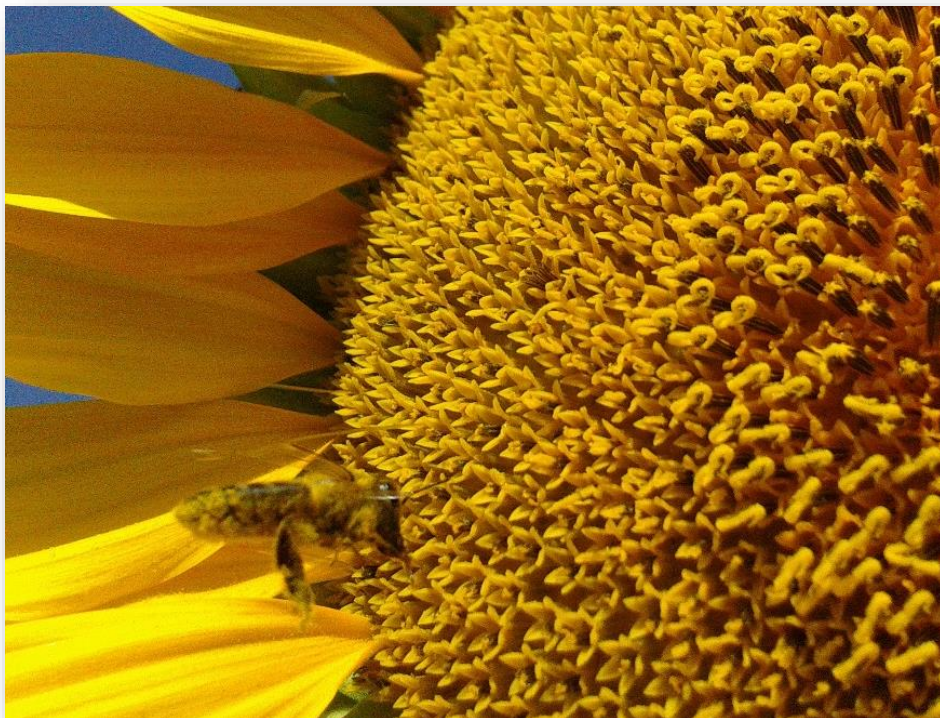
In this work, different strategies to control nosemosis are analyzed. The first of all, prophylactic measures were evaluated to determine the sporicidal capacity of several products to clean beekeeping material. To do this, a new methodology was previously developed. This methodology allowed us to determine that several common products such as ammonia, bleach and acetic acid were able to disinfect beekeeping material, eliminating *N. ceranae* spores. Other commercial products such as Mycoplasma OFF™ has a similar effect. Prophylactic techniques should be part of disease control system since it avoids the entry and diffusion of the pathogens by anthropogenic action, reducing the risk of infection in healthy colonies.

The reduced availability of effective drugs for control of the nosemosis determine the importance of searching new products to reduce the effects of the infection and to improve the colony health. In this work, several products, mainly of natural origin, had shown to be effective against *N. ceranae* in laboratory and field conditions. Tannic acid showed comparable results to fumagillin under laboratory conditions. Under field conditions, a single treatment in autumn with resveratrol, toltrazuril or tannic acid was enough to keep low parasite levels during the winter. Consequently, those colonies treated with any of these products went into spring in better sanitary conditions than those without autumn treatment.

During the searching for target genes for metaphylactic and therapeutical technics with molecular basis, the microsporidium infection was monitored by determining the parasite gene expression and by electron microscopy. It was observed that the cycle of *N. ceranae* is completed at 36 hours post infection, due to the formation of primary spores in bee ventricle's cells at this time. The early detection of the polar tubule protein gene at 36 hours post-infection suggested it as a possible therapeutic target. Beside to the *PTP3* gene, other genes were also selected to design a treatment based on the RNAi technique, which has been shown to be able to decrease the replication and development of the pathogen in other organisms. In this work, treatment with dsRNA of the selected genes significantly decreased the spore count of *N. ceranae* in the treated bees.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS





## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Adl** SM, Simpson AG, Lane CE, Lukes J, Bass D, Bowser SS, Brown M, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, y col. The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **2012**; 59 (5):429-93.

**Adl**, SM, Simpson, AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, y col. The new higher-level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **2005**; 52: 399–451.

**Agencia Europea de Medicamentos** (EMA/CVMP/414812/2011-Rev.1) [internet]; **2015** [citado Mayo 2015], revisado Dic 2016. Disponible en: <http://www.ema.europa.eu/>

**Ai** H, Yan X, Han R. Occurrence and prevalence of seven bee viruses in *Apis mellifera* and *Apis cerana* apiaries in China. *Journal Invertebrate Pathology*, **2012**; 109: 160–164.

**Al Hafi** M, El Beyrouthy M, Ouaini N, Stien D, Rutledge D, Chaillou S. Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja*, *Thymus* and *Thymbra* species grown in Lebanon. *Chemistry and Biodiversity*, [internet]; **2016** (revisado Ene 2017). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201600236>

**Al Hafi** M, El Beyrouthy M, Ouaini N, Stien D, Rutledge D, Chaillou S. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Origanum libanoticum*, *Origanum ehrenbergii*, and *Origanum syriacum* Growing Wild in Lebanon. *Chem Biodivers*. **2016**; 13(5):555-60.

**Alaux** C, Brunet J-L, Dussaubat C, Mondet F, Tchamitchan S, Cousin M, y col. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology*. **2010**; 2(3):774–82.

**Alaux** C, Crauser D, Pioz M, Saulnier C, Le Conte Y. Parasitic and immune modulation of flight activity in honey bees tracked with optical counters. *Journal of Experimental Biology*. **2014**; 217(19):3416–24.

**Albo** G, Henning C., Ringuelet J., Reynaldi F., De Giusti M., Alippi A. Evaluation of some essential oils for the control and prevention of American Foulbrood disease in honey bees. *Apidologie* **2003**; 34: 417- 27. 2.

**Albo** G, Reynaldi F, Yordaz M, Henning C. Toxicidad de aceites esenciales con efecto fungistático sobre *Ascosphaera apis* en larvas y adultos de *Apis mellifera*, L. *Veterinaria Cuyana* **2008**; 3(2):1-7.

**Albo** G, Henning C, Ringuelet J, Reynaldi F, Ringuelet J, Cerimele E. Dosis Letal Media (DL50) de algunos aceites esenciales y biocidas efectivos para el control de *Ascosphaera apis* en *Apis mellifera* L. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria* **2010**; 11-10: 1695-7504

**Aliferis** KA, Copley T, Jabaji S. Gas chromatography–mass spectrometry metabolite profiling of worker honey bee (*Apis mellifera* L.) hemolymph for the study of *Nosema ceranae* infection. *Journal Insect Physiology*. **2012**; 58(10):1349–59.

- Allen M**, y Ball BV. The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World* **1996**; 77:141–162
- Amdam G**, Simoes Z, Guidugli K, Norberg K, Omholt S. Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Biotechnology*. **2003a**; 3, 1.
- Amdam GV**, Omholt SW. The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. *Journal of theoretical biology*. **2003b**; 223, 451–464.
- Amdam GV**, Norberg K, Page JRE, Erber J, Scheiner R. Downregulation of vitellogenin gene activity increases the gustatory responsiveness of honey bee workers (*Apis mellifera*). *Behaviour Brain Research* **2006**; 169:201-205.
- Anderson DL**, Giacon H. Reduced pollen collection by honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies infected with *Nosema apis* and Sacbrood virus. *Journal Economic Entomology*. **1992**; 85 (1).
- Antúnez K**, D'Alessandro B, Corbella E, Ramallo G, Zunino P. Honey bee viruses in Uruguay. *Journal Invertebrate Pathology*. **2006**; 91(1):67–70.
- Antúnez K**, Piccini C, Castro-Sowinski S, Rosado AS, Seldin L, Zunino P. Phenotypic and genotypic characterization of *Paenibacillus* larvae isolates. *Veterinary Microbiology*. **2007**; 124(1-2):178–83.
- Antúnez K**, Harriet J, Gende L, Maggi M, Eguaras M, Zunino P. Efficacy of natural propolis extract in the control of American Foulbrood. *Veterinary Microbiology*. **2008**; 131(3-4):324–31.
- Antúnez K**, Martín-Hernández R, Prieto L, Meana A, Zunino P, Higes M. Immunesuppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology*. **2009**; 11(9):2284–90.
- Antúnez K**, Anido M, Evans JD, Zunino P. Secreted and immunogenic proteins produced by the honeybee bacterial pathogen, *Paenibacillus* larvae. *Veterinary Microbiology*. **2010**; 141(3–4):385–9.
- Antúnez K**, Anido M, Branchiccela B, Harriet J, Campá J, Zunino P. American foulbrood in Uruguay: twelve years from its first report. *Journal of Invertebrate Pathology*. **2012a**; 110(1):129–31.
- Antúnez K**, Anido M, Garrido-Bailón E, Botías C, Zunino P, Martínez-Salvador A, y col. Low prevalence of honeybee viruses in Spain during 2006 and 2007. *Research in Veterinary Science*. **2012b**; 93(3):1441–5.
- Antúnez K**, Anido M, Branchiccela B, Harriet J, Campa J, Invernizzi C, y col. Seasonal variation of honeybee pathogens and its association with pollen diversity in Uruguay. *Microbial Ecology*. **2015**; 7(2):522-33.
- Arculeo P**. Ácido oxálico, experiencia realizada en el Sur de Italia. *Vida Apícola* **2000**; 102, 44-48.
- Ares AM**, Nozal MJ, Bernal JL, Martín-Hernández R, Higes M, y Bernal J. Liquid chromatography coupled to ion trap-tandem mass spectrometry to evaluate juvenile hormone III levels in bee hemolymph from

*Nosema* spp. infected colonies. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed and Life Science. **2012**; 15; 899: 146-53.

**Ares** AM, González Y, Nozal MJ, Bernal JL, Higes M, Bernal J. Development and validation of a liquid chromatography with mass spectrometry method to determine resveratrol and piceid isomers in beeswax. Journal of Separation Science. **2015a**; 38:197–204.

**Ares** AM, Nozal MJ, Bernal J. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method to determine intact glucosinolatos in bee pollen. Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. **2015b**; 1; 1000: 49-56.

**Ares** AM, Valverde S, Nozal MJ, Bernal JL, Bernal J. Development and validation of a specific method to quantify intact glucosinolates in honey by LC–MS/MS, Journal of Food Composition and Analysis. **2016**; 46, 114.

**Aronstein** K, Hayes G. Antimicrobial activity of allicin against honeybee pathogens. Journal of Apiculture Research. **2004**; 43, 57–59.

**Aronstein** KA, Webster TC, y Saldivar E. A serological method for detection of *Nosema ceranae*. Journal of Applied Microbiology, **2013**; 114(3), 621–625.

**Aufauvre** J, Misme-Aucouturier B, Viguès B, Texier C, Delbac F, Blot N. Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides. PLoS One. **2014**; 9(3): e91686.

**Bailey** L. The Infection of the ventriculus of the adult honeybee by *Nosema apis* (Zander). Parasitology, **1955**; 45: 1-2, 86-94.

**Bailey**, L., The epidemiology and control of *Nosema* disease of the honey-bee. Annals of Applied Biology. **1955**; 43, 379–389.

**Bailey** L. The effect of temperature on the pathogenicity of the fungus, *Ascosphaera apis*, for larvae of the honey bee, *Apis mellifera*. Insect pathology and microbial control. **1967**; 162–7.

**Bailey** L, Ball BV, Perry JN. The prevalence of viruses of honey bees in Britain. Annals of Applied Biology. **1981**; 97(1):109–18.

**Bailey** L, Ball BV. Honey bee pathology. Academic Press, 2nd ed. London. **1991**.

**Baker** AC, Schroeder DC. The use of RNA-dependent RNA polymerase for the taxonomic assignment of picorna-like viruses (order Picornavirales) infecting *A. mellifera* L. populations. Virology Journal. **2008**; 5: 10.

**Baltaci** SB, Mogulkoc R, Baltaci AK. Resveratrol and exercise. Biomedical Reports. **2016**; 5(5):525-530.

**Barbero** R, Panella F. y Bonizzoni L. Acido oxálico y el tratamiento de limpieza radical de otoño-invierno. Vida apícola, **1997**; 85: 8-13.

- Basualdo** M, Barragán S, y Antúnez K. Bee bread increases honeybee haemolymph protein and promote better survival despite of causing higher *Nosema ceranae* abundance in honeybees. *Environmental Microbiology Reports* **2014**; 6(4), 396–400.
- Becnel** JJ, Andreadis, TG. Microsporidia in insects. In: Murray, W., Louis, M.W. (Eds.). *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society of Microbiology. **1999**; 447–501.
- Bekele** AZ, Mor SK, Phelps NBD, Goyal SM, Armien AG. A case report of *Nosema ceranae* infection in honey bees in Minnesota, USA. *Veterinary Quaterly*. **2015**; 35(1):48–50.
- Benjeddou** M, Leat N, Allsopp M, Davison S. Detection of acute bee paralysis virus and black queen cell virus from honeybees by reverse transcriptase PCR. *Applied of Environmental Microbiology*. **2001**; 67:2384–7.
- Berenyi** O, Bakonyi T, Derakhshifar I, Koglberger H, Nowotny N. Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries, *Applied of Environmental Microbiology*. **2006**; 72, 2414–2420.
- Bermejo** FJ y García- Fernández P. Nosema disease in the honey bee (*Apis mellifera* L.) infested with varroa mites in southern Spain. *Apidologie*, **1997**; 28, 105-112.
- Bernal** J, Garrido-Bailón E, Del Nozal M J, González-Porto AV, Martín-Hernández R, Diego JC, Higes M. Overview of pesticide residues in stored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. *Journal of Economic Entomology*, **2010**; 103(6): 1964–1971.
- Berry** ED y Cutter CN. Effects of acid apatation of Escherichia coli O157:H7 on efficacy of acetic acid spray washes to descontaminate beef carcass tissue. *Applied of Environmental Microbiology*. **2000**; 66 (4): 1493-1498.
- Bessi** E, Nanetti A. Evaluation of tree different strategies to nosema control. *Proceedings of meeting 39th Apimondia International Apicultural Congress*, 21-26 August **2005**, Ireland.
- Betti** MI, Wahl LM, Zamir M. Effects of infection on honey bee population dynamics: a model. *PLoS One*. **2014**; 9(10):e110237.
- Botías** C, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, González-Porto A, Martínez-Salvador A, De la Rúa P, Higes M. The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade. *Research in Veterinary Science*, **2011**; 93(1), 150–5.
- Botías** C, Martín-Hernández R, Barrios L, Garrido-Bailón E, Nanetti A, Meana A, e Higes, M. *Nosema spp.* parasitization decreases the effectiveness of acaricide strips (Apivar®) in treating varroosis of honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Environmental Microbiology Reports*, **2012a**; 4(1), 57–65.
- Botías** C, Martín-Hernández R, Días J, García-Palencia P, Matabuena M, Juarranz Á, y col. The effect of induced queen replacement on *Nosema spp.* infection in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies: queen replacement influences *Nosema* infection in honey bee colonies. *Environmental Microbiology*. **2012b**; 14(4):845–59.

**Botías C**, Anderson DL, Meana A, Garrido-Bailón E, Martín-Hernández R, e Higes M. Further evidence of an oriental origin for *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, **2012c**; 110(1), 108–13.

**Botías C**, Martín-Hernández R, Barrios L, Meana A, Higes M. *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Veterinary Research*. **2013a**; 44(1):25.

**Botías C**, Martín-Hernández R, Meana A, Higes M. Screening alternative therapies to control Nosemosis type C in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Research in Veterinary Science*, **2013b**; 95(3): 1041–1045.

**Bourgeois AL**, Rinderer TE, Sylvester HA, Holloway B, Oldroyd BP. Patterns of *Apis mellifera* infestation by *Nosema ceranae* support the parasite hypothesis for the evolution of extreme polyandry in eusocial insects. *Apidologie*. **2012**; 43(5):539–48.

**Bowen-Walker PL**, Martin SJ, Gunn A. The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Journal of Invertebrate Pathology* **1999**; 73, 101–106.

**Branchiccela B**, Arredondo D, Higes M, Invernizzi C, Martín-Hernández R, Tomasco I, Zunino P, Antúnez K. Characterization of *Nosema ceranae* Genetic Variants from Different Geographic Origins. *Microbial Ecology*. **2016**; 1-10.

**Brutscher LM**, Flenniken ML. RNAi and Antiviral Defense in the Honey Bee. Review. *Journal of Immunology Research*. **2015**. Article ID 941897, 10 pages.

**Budge G**. *Nosema ceranae*. What is *Nosema ceranae* and how do you test for it? *Bee Craft Journal*. **2008**; 1:7–8.

**Burt SA**, Adolfse SJM, Ahad DSA, Tersteeg-Zijderveld MHG, Jongerius-Gortemaker BGM, Post JA, Brüggemann H, y Santos RR. Cinnamaldehyde, carvacrol and organic acids affect gene expression of selected oxidative stress and inflammation markers in IPEC-J2 cells exposed to *Salmonella typhimurium*. *Phytotherapy Research*. **2016**; 30: 1988–2000.

**Campbell EM**, Budge GE, Watkins M, Bowman AS. Transcriptome analysis of the synganglion from the honey bee mite, *Varroa destructor* and RNAi knockdown of neural peptide targets. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **2016**; 70:116-26.

**Cantwell GE**, y Shimanuki H. The use of heat to control *Nosema* and increase production for the commercial beekeeper. *American Bee Journal*. **1970**; 110:263.

**Cantwell GE**. Standard methods for counting nosema spores. *American Bee Journal*. **1970**; 110, 222–223

**Carrasco-Letelier L**, Mendoza Y, y Ramallo G. Acute Contact Toxicity Test of Oxalic Acid on Honeybees in the Southwestern Zone of Uruguay. *Chilean Journal of Agricultural Research* **2012**; 72(2).

**Cepero A**, Ravoet J, Gómez-Moracho T, Bernal JL, Del Nozal MJ, Bartolomé C, Higes M. Holistic screening of collapsing honey bee colonies in Spain: a case study. *BMC Research Notes*. **2015**; 7, 649.

**Chaimanee V**, Chen YP, Pettis JS, Cornman SR, y Chantawannakul P. Phylogenetic analysis of *Nosema ceranae* isolated from European and Asian honeybees in Northern Thailand. *Journal of Invertebrate Pathology*. **2011**; 107, 229–233.

**Chaimanee V**, Chantawannakul P, Chen Y, Evans J, Pettis J. Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *Journal of Insect Physiology* **2012**; 58: 1090–1095.

**Chamaine V**, Chantawannakul, P., Chen, Y. y col. Effects of host age on susceptibility to infection and immune-gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) inoculated with *Nosema ceranae* *Apidologie*. **2014**; 45: 451.

**Chantawannakul P**, Ward L, Boonham N, Brown M. A scientific note on the detection of honeybee viruses using real-time PCR (TaqMan) in Varroa mites collected from a Thai honeybee (*Apis mellifera*) apiary. *Journal of Invertebrate Pathology*. **2006**; 91(1):69-73.

**Charbonneau LR**, Hillier NK, Rogers REL, Williams GR, y Shutler, D. Effects of *Nosema apis*, *N. ceranae*, and co-infections on honey bee (*Apis mellifera*) learning and memory. *Scientific Reports*, **2016**; 6:22626.

**Charpentier G**, Vidau C, Ferdy JB, Tabart J, Vetillard A. Lethal and sub-lethal effects of thymol on honeybee (*Apis mellifera*) larvae reared in vitro. *Pest Management Science*. **2014**; 70(1):140-7.

**Chen X**, Xie S, Bhat S, Kumar N, Shapiro TA, Liu JO. Fumagillin and fumarranol interact with *P. falciparum* methionine aminopeptidase 2 and inhibit malaria parasite growth in vitro and in vivo. *Chemistry Biology journal*. **2009**; 27: 16(2):193-202.

**Chen Y**, Zhao Y, Hammond J, Hsu HT, Evans JD, Feldlaufer MF. Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses. *Journal of Invertebrate Pathology*. **2004a**; 87:84-93.

**Chen YP**, Smith IB, Collins AM, Pettis JS, Feldlaufer MF. Detection of deformed wing virus infection in honey bees, *Apis mellifera* L., in the United States. *American Bee Journal* **2004b**; 144: 557–559.

**Chen YP**, Higgins JA, Feldlaufer MF. Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Applied and Environmental Microbiology* **2005a**; 71(1): 436-441.

**Chen YP**, Pettis JS, Feldlaufer MF. Detection of multiple viruses in queens of the honey bee *Apis mellifera* L. *Journal of Invertebrate Pathology* **2005b**; 90(2): 118–121.

**Chen YP**, Evans J, Hamilton M, Feldlaufer M. The influence of RNA integrity on the detection of honey bee viruses: molecular assessment of different sample storage methods. *Journal of Apicultural Research* **2007**; 46(2): 81–87.

**Chen Y**, Evans JD, Smith IB, Pettis JS. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. Journal of Invertebrate Pathology. **2008**; 97(2):186–8.

**Chen YW**, Chung WP, Wang CH, Solter LF, y Huang F. *Nosema ceranae* infection intensity highly correlates with temperature. Journal of Invertebrate Pathology, **2012**; 111(3), 264–7.

**Chen YP**, Pettis JS, Corona M, Chen WP, Li CJ, Spivak M, y col. Israeli Acute Paralysis Virus: Epidemiology, Pathogenesis and Implications for Honey Bee Health. PLoS Pathogens **2014**; 10(7): e1004261.

**Chiesa F**, D'Agaro M. Effective control of varroaosis using powdered thymol. Apidologie, **1991**; 22:135–145.

**Chung KG**, Wong TY, Wei CI, Huang YW y Lin Y. Tannins and Human Health: A Review. Critical reviews in food science and nutrition. **1998**; 38: 6.

**COLOSS workshop** Conclusions, Proc. Workshop “Nosema disease: lack of knowledge and work standardization” (COST Action FA0803) Coloss [Internet]. **2009** (publicado el 20 Nov 2009). Disponible en: <http://www.coloss.org/news/nosema-workshop-proceedings-online>

**Conaway CC**, Yang Y y Chung FL. Isothiocyanates as cancer chemopreventive agents: their biological activities and metabolism in rodents and humans. Current Drug Metabolism. **2002**; 3: 233-255.

**Copley TR**, Chen H, Giovenazzo P, Houle E, Jabaji SH. Prevalence and seasonality of *Nosema* species in Québec honey bees. Can Entomol **2012**; 144:577–588.

**Cornman RS**, Chen YP, Schatz MC, Street C, Zhao Y, y col. Genomic Analyses of the Microsporidian *Nosema ceranae*, an Emergent Pathogen of Honey Bees. PLoS Pathogens. **2009**; 5(6): e1000466.

**Cornman RS**, Tarpy DR, Chen Y, Jeffreys L, Lopez D, Pettis JS, vanEngelsdorp D, Evans JD: Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. PLoS ONE **2012**; 7:e43562.

**Cortesía C**, Vilchère C, Bernut A, Contreras W, Gómez K, de Waard J, Jacobs WR, Jr, Kremer L, Takiff H. Acetic acid, the active component of vinegar, is an effective tuberculocidal disinfectant. mBio **2014**; 5(2):e00013-14.

**Costa SF**, Weiss LM. Drug treatment of microsporidiosis. Drug Resistance Updat. **2000**; 3(6):384-399.

**Costa C**, Lodesani M, Maistrello L. Effect of thymol and resveratrol administered with candy or syrup on the development of *Nosema ceranae* and on the longevity of honey bees (*Apis mellifera* L.) in laboratory conditions. Apidologie. **2010**; 41 (2), 141-150.

**Costa C**, Tanner G, Lodesani M, Maistrello L, y Neumann P. Negative correlation between *Nosema ceranae* spore loads and deformed wing virus infection levels in adult honey bee workers. Journal of Invertebrate Pathology, 108 **2011**; (3), 224–5.

**Cox-Foster** DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Briesse T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, vanEngelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai J, Cui L, Hutchison SK, Simons JF, Egholm M, Pettis JS, Lipkin WI. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*. **2007**; 12: 318(5848):283-7.

**Da Silva** MF, Rodrigues AC, Campaner M, Takata CS, Brigido MC, Junqueira AC, Coura JR, Takeda GF, Shaw JJ, Teixeira MM. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. *Parasitology*. **2004**; 128(3),283-94.

**Dainat** B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L, Neumann P Dead or alive: deformed wing virus and Varroa destructor reduce the life span of winter honeybees. *Applied of Environmental Microbiology* **2012**; 78: 981–987.

**Damiani** N, Fernández N, Porrini M, Gende L, Álvarez E, Buffa F, Brasesco C, Maggi M, Marcangeli J, Eguaras M. Laurel leaf extracts for honeybee pest and disease management: antimicrobial, microsporidial, and acaricidal activity. *Parasitology Research*. **2014**; 113: 701-709.

**Delaplane** KS, van der Steen J, Guzman E. Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. In Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research*. **2013**; 52(1).

**Deplazes** P, Eckert J, Mathis A, Samson-Himmelstjerna GC, Zahner H. *Parasitology in veterinary medicine*. Wageningen Academic Publishers; **2016**.

**Desai** SD. Reduction in deformed wing virus infection in larval and adult honey bees (*Apis mellifera* L.) bt double-stranded RNA ingestion. *Insect Molecular Biology*. **2012**; 21(4):446-55.

**Didier** ES. Effects of albendazole, fumagillin and TNP-470 on microsporidial replication in vitro. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **1997**; 41, 1541–1546.

**Didier** ES, Wossbrinck CR, Stowall ME, Green LC, Bowers L, Fredenburg A, Didier PJ. Diagnosis and epidemiology of microsporidian infections in humans. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **2004**; 35, 65–81.

**Didier** ES, Maddry JA, Brindley PJ, Stovall ME, Didier PJ. Therapeutic strategies for human microsporidia infections. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* **2005**; 3, 419–434.

**Didier** ES, Weiss LM. Microsporidiosis: current status. *Current Opinion in Infectious Diseases* **2006**; 19: 485–492.

**Di Pasquale** G, Salignon M, Le Conte Y, Belzunces LP, Decourtaye A, Kretzschmar A, et al. Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? *PLoS ONE* **2013**; 8(8): e72016.



**Dorman** HJD. Phytochemistry and bioactive properties of plant volatile oils: antibacterial, antifungal and antioxidant activities. **1999**; Tesis doctoral, University of Strathclyde, Glasgow.

**Doublet** V, Natsopoulou ME, Zschiesche L, Paxton RJ. Within-host competition among the honey bees pathogens *Nosema ceranae* and *Deformed wing virus* is asymmetric and to the disadvantage of the virus. *Journal of Invertebrate Pathology*. **2015**; 124:31-4.

**Doull** KM. The effects of time of day and method of sampling on the determination of nosema disease in bee hives. *Journal of Invertebrate Pathology* **1965**; 7(1): 1-4.

**Duquesne** V, Delcont A, Cougoule N, Ribiere-Chabert M. An inter-laboratory comparison of molecular methods for identification of *Nosema* species in Honey bee samples. Libro de resúmenes del congreso Eurbee 7, Rumania; **2016**.

**Dussaubat** C, Brunet J-L, Higes M, Colbourne JK, López J, Choi J-H, y col. Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS One*. **2012**; 7(5):e37017.

**Dussaubat** C, Sagastume S, Gómez-Moracho T, Botías C, García-Palencia P, Martín- Hernández R, y col. Comparative study of *Nosema ceranae* (Microsporidia) isolates from two different geographic origins. *Veterinary Microbiology*. **2013b**; 162(2-4):670–8.

**Dutra** RP, Abreu BV, Cunha MS, Batista MC, Torres LM, Nascimento FR, Ribeiro MN, Guerra RN. Phenolic acids, hydrolysable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **2014**; 26: 62(12):2549-57.

**Eiri** DM, Suwannapong G, Endler M, y Nieh JC. *Nosema ceranae* Can Infect Honey Bee Larvae and Reduces Subsequent Adult Longevity. *Plos One*, **2015**; 10(5).

**Eischen** FA, Graham RH, Rivera R. Impact of *Nosema ceranae* on honey bee colonies: A 14 month study. Libro de resúmenes del congreso American Bee Research Conference, Maryland, US; **2012**.

**Emsen** B, Guzman-Novoa E, Hamiduzzaman MM, Eccles L, Lacey B, Ruiz-Pérez RA. Higher prevalence and levels of *Nosema ceranae* than *Nosema apis* infections in Canadian honey bee colonies. *Parasitology Research*. **2016**; 115(1):175-81.

**Erland** LA, Bitcon CR, Lemke AD, Mahmoud SS. Antifungal Screening of Lavender Essential oils and Essential Oil Constituents on three Post-harvest Fungal Pathogens. *Natural Products Communications*. **2016**; 11(4):523-7.

**Evans** JD, Aronstein K, Chen YP, Hetru C, Imler J-L, Jiang H, Kanost M, Thompson GJ, Zou Z, y Hultmark D. Immune pathways and defense mechanisms in honey bees *Apis mellifera* *Insect Molecular Biology*. **2006**; 15(5): 645–656.

**Evans** JD, Chen YP, Prisco Gd, Pettis J, Williams V. Bee cups: single-use cages for honey bee experiments. *Journal of Apiculture Research*. **2009**; 48:300-302.

- Fabbri** J, Maggiore MA, Pensel PE, Denegri GM, Gende LB, Elisondo MC. In vitro and in vivo efficacy of carvacrol against *Echinococcus granulosus*. *Acta Tropica journal*. **2016**; 164:272-279.
- Fahey** JW, Zalcmann AT, Talalay P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*. **2001**; 56(1):5-51.
- Fahey** W, Zalcmann A, Talalay P. Corrigendum to “The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants”. *Phytochemistry*. **2002**; 59(2) -237.
- Farrar** CL. Nosema losses in package bees as related to queen supersedure and honey yields. *Journal Economic Entomology*. **1947**; 40:333–338.
- Fenoy** S, Rueda C, Higes M, Martín-Hernández R, del Aguila C. High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. *Applied of Environmental Microbiology*. **2009**; 75(21):6886-9.
- Fernández** JM, Puerta F, Cousinou M, Dios-Palomares R, Campano F, y Redondo L. Asymptomatic presence of *Nosema* spp. in Spanish commercial apiaries. *Journal of Invertebrate Pathology*, **2012**; 111(2), 106–110.
- Fernández-Mar** MI, Mateos R, García-Parrilla MC, Puertas B, Cantos-Villar E. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chemistry* **2012**; 130: 797–813.
- Fernández-Vadillo** C. Desarrollo de anticuerpos monoclonales frente a *Nosema ceranae* como aportación al diagnóstico del síndrome de despoblamiento. Tesis doctoral Carmen Fernández Vadillo, **2014** Universidad Complutense de Madrid.
- Flenniken** ML, Andino R. Non-Specific dsRNA-Mediated Antiviral Response in the Honey Bee. *PLoS ONE*, **2013**; 8(10): e77263.
- Fontbonne** R, Garnery L, Vidau C, Aufauvre J, Texier C, Tchamitchian S, y col. Comparative susceptibility of three Western honeybee taxa to the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. *Infection, Genetics and Evolution Journal*. **2013**; 17:188–94.
- Forsgren** E, Fries I. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Veterinary Parasitoly*. **2010**; 170(3-4):212–7.
- Forsgren** E, y Fries I. Temporal study of *Nosema* spp. in a cold climate. *Environmental Microbiology Reports*, **2013**; 5(1), 78–82.
- Fraise** A. Currently available sporicides for use in healthcare, and their limitations. *The Journal of hospital infection* **2011**; 77(3):210-2.
- Franssen** FF, Lumeij JT, van Knapen F. Susceptibility of *Encephalitozoon cuniculi* to several drugs in vitro. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **1995**; 39(6):1265-8.

**Fries I**, Feng F, Da Silva A, Slemenda SB, Pieniazek J. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae). Morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal Protistology*. **1996**; 32(3):356–65.

**Fries I**. Protozoa. Honey Bee Pests, predators, and diseases, 3rd ed. **1997**; 57–76.

**Fries, I**. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, **2010**; 103: S73-9.

**Fries I**, Chauzat M-P, Chen Y-P, Doublet V, Genersch E, y col. Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research*, **2013**; 52: 1–28.

**Gajger TI**, Vubrek O, Pinter L, Petrinc Z. “Nozevit patties” Treatment of Honey Bees (*Apis mellifera*) for the control of *Nosema ceranae* disease. *American bee journal*; **2009**. 149(11): 1053-1056.

**Gajger TI**, Kozaric Z, Berta D, Nejedly S, Petrinc Z. Effect of the herbal preparation Nozevit on the mid-gut structure of honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema* sp. Spores. *Veterinarni Medicina*, **2011**; 56- (7): 344–351

**Gajger TI**, Nejedly S, Kozaric Z. The effect of Nozevit on leucine aminopeptidase and esterase activity in the midgut of honey bees (*Apis mellifera*). *Veterinarni Medicina*, **2013**; 58-(8): 422–429.

**Gajger TI**, Tomljanovic Z, Stanisavljevic LJ. An environmentally friendly approach to the control of *Varroa destructor* mite and *Nosema ceranae* disease in Carniolan honeybee (*Apis mellifera carnica*) colonies. *Archives of Biological Science Belgrade*. **2013**; 65: 1585-1592.

**Garbian Y**, Maori E, Kalev H, Shafir S, Sela I. Bidirectional Transfer of RNAi between Honey Bee and *Varroa destructor*: *Varroa* Gene Silencing Reduces *Varroa* Population. *PLoS Pathogens*. **2012**; 8(12).

**Garrido PM**, Porrini MP, Antúnez K, Branchiccela B, Martínez-Noël GM, Zunino P, Salerno G, Eguaras MJ, Ieno E. Sublethal effects of acaricides and *Nosema ceranae* infection on immune related gene expression in honeybees. *Veterinary Research*. **2016**; 26; 47(1):51.

**Garrido-Bailón E**. Repercusión potencial en la cabaña apícola española de agentes nosógenos detectados en colonias de “*Apis mellifera iberiensis*.” Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid. **2012**.

**Gatehouse HS**, y Malone LA. The ribosomal RNA gene region of *Nosema apis* (Microspora): DNA sequence for small and large subunit rRNA genes and evidence of a large tandem repeat unit size. *Journal of Invertebrate Pathology*, **1998**; 71(2), 97–105.

**Gauthier L**, Tentcheva D, Tournaire M, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M: Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique. *Apidologie* **2007**; 38:426-435.

**Gelats** FL, Rojas VV, Rivera-Ferre MG. Impactos, vulnerabilidad y adaptación al cambio climático de la apicultura mediterránea [internet]. Universidad central de Cataluña; **2016** [citado 12 Dic 2016]. Disponible en: <http://mon.uvic.cat/catedra-agroecologia/files/2016/10/Informe-Apicultura-y-CC.pdf>

**Genersch** E, Aubert M. Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). Veterinary Research. **2010**; 41: 54.

**Genersch** E, Von Der Ohe W, Kaatz H, Schroeder A, Otten C, Bacchler R, Rosenkranz P. The German bee monitoring project: A long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. Apidologie. **2010**; 41(3), 332–352.

**Gerig** L. Lehrgang zur Erfassung der Volksstärke. Schweiz. Bienen-Z. **1983**; 155-174.

**Giacobino** A, Rivero R, Molineri AI, Cagnolo NB, Merke J, Orellano E, Salto C, Signorini M. Fumagillin control of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) infection in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies in Argentina. Veterinaria Italiana. **2016a**; 30; 52(2):145-51.

**Giacobino** A, Molineri A, Bulacio Cagnolo N, Merke J, Orellano E, Bertozzi E, Signorini M. Key management practices to prevent high infestation levels of *Varroa destructor* in honey bee colonies at the beginning of the honey yield season. Preventive Veterinary Medicine. **2016b**; 131, 95–102.

**Giersch** T, Berg T, Galea F, Hornitzky M, y col. *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. Apidologie. **2009**; 40(2):117–23.

**Gilliam** M, Shimanuki H. In vitro phagocytosis of *Nosema apis* spores by honey-bee hemocytes. J Invertebrate Pathology. **1967**; 9(3):387–9.

**Gisder** S, Hedtke K, Mockel N, Frielitz MC, Linde A, Genersch E. Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: Does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? Applied of Environmental Microbiology. **2010**; 76(9):3032–8.

**Gisder** S, Genersch E. Identification of candidate agents active against *N. ceranae* infection in honey bees: establishment of a medium throughput screening assay based on *N. ceranae* infected cultured cells. PLoS One. **2015**; 6-10(2): e0117200.

**Gisder** S, y Genersch E. Special issue: Honey bee viruses. Viruses, **2015**; 7(10), 5603–5608.

**Goblirsch** M, Huang ZY, Spivak M. Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. PLoS One. **2013**; 8(3): e58165.

**Gómez** A. Nosemiasis, varroasis. Situación actual. Vida Apícola. **1998**; 88:51–4.

**Gómez-Moracho** T, Maside X, Martín-Hernández R, Higes H, y Bartolome C. High levels of genetic diversity in *Nosema ceranae* within *Apis mellifera* colonies. Parasitology. **2013**; 141: 475–481.

**Gómez-Moracho** ., Bartolomé C, Martín-Hernández R, Higes M, y Maside X. Evidence for weak genetic recombination at the PTP2 locus of *Nosema ceranae*. Environmental Microbiology. **2014**; 17: 1300–1309.

**Gómez-Moracho** T, Bartolomé C, Bello X, Martín-Hernández R, Higes M, Maside X. Recent worldwide expansion of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in *Apis mellifera* populations inferred from multilocus patterns of genetic variation. Infection Genetics and Evolution. **2015**; 31, 87–94.

**González** MJ, Marioli JM. Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic plants against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood. Journal of Invertebrate Pathology. **2010**; 104(3):209-13.

**Granberg** F, Vicente-Rubiano M, Rubio-Guerri C, Karlsson OE, Kukielka D, Belák S, Sánchez-Vizcaíno JM: Metagenomic detection of viral pathogens in Spanish honeybees: co-infection by Aphid lethal paralysis, Israel acute paralysis and Lake Sinai viruses. PLoS ONE **2013**; 8:e57459.

**Gordon** RF y **Jordan** FTW. Poultry diseases. 3<sup>º</sup> ed. Published por Bailliere Tindall. **1990**.

**Graystock** P, Yates K, Darvill B, Goulson D y Hughes W. Emerging dangers: Deadly effects of an emergent parasite in a new pollina- tor host. Journal of Invertebrate Pathology. **2013**; 114: 114–119.

**Gregorc** A., Pogacnik A., Bowen I.D. Cell death in honeybee (*Apis mellifera*) larvae treated with oxalic or formic acid, Apidologie **2004**; 35: 453–460.

**Gregorc** A., Smodiš Škerl M.I. Toxicological and immunohistochemical testing of honeybees after oxalic acid and rotenone treatment. Apidologie. **2007**; 38: 296–305.

**Grozinger** CM, Robinson GE. The power and promise of applying genomics to honey bee health. Current Opinion in Insect Science. **2015**; 1-10:124-132.

**Guzman-Novoa** E, Emsen B, Unger P, Espinosa-Montaña LG, Petukhova T. Genotypic variability and relationships between mite infestation levels, mite damage, grooming intensity, and removal of *Varroa destructor* mites in selected strains of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). Mexico. Journal of Invertebrate Pathology. **2012a**; 110: 314–320.

**Guzman-Novoa** E, Hamiduzzaman MM., Espinosa-Montaña LG, Correa-Benítez A, Anguiano-Baez R, Ponce-Vázquez R. First detection of four viruses in honey bee (*Apis mellifera*) workers with and without deformed wings and *Varroa destructor* in Mexico. Journal of Apiculture Research. **2012b**; 51: 342–346.

**Halkier** BA, Gershenzon J. Biology and biochemistry of glucosinolatos. Annual Review of Plant Biology. **2006**; 57:303-33.

**Hammond** SM, Caudy AA, Hannon GJ. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. Nature Reviews Genetics. **2001**; 2(2):110-9. Review.

- Hatjina** F, Tsoktouridis G, Bouga M, Charistos L, Evangelou V, Avtzis D, Meeus I, Brunain M, Smagghe G y De Graaf DC. Polar tube protein gene diversity among *Nosema ceranae* strains derived from a Greek honey bee health study. *Journal of Invertebrate Pathology*. **2011**; 108, 131–134.
- Hecht** SS. Chemoprevention by isothiocyanates. *Journal of Cellular Biochemistry*. **1995**; 22: 195-209
- Hecht** SS. Inhibition of carcinogenesis by isothiocyanates. *Drug Metabolism Review*. **2000**; 32: 395-411.
- Hedtke** K, Jensen PM, Jensen AB, Genersch E. Evidence for emerging parasites and pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalkbrood. *Journal of Invertebrate Pathology*. **2011**; 108(3):167–73.
- Heintz** C, Ribotto M, Ellis M, Delaplane K. Best management practices (BMPs) for beekeepers pollinating California’s agricultural crops. Managed Pollinator CAP Coordinated Agricultural Project. *Bee Culture*, **2011**; 17–19.
- Higes** M, Meana A, Suárez M y Llorente J. Negative long term effects on bee colonies treated with oxalic acid against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, **1999**; 30: 289-292.
- Higes** M. Eficacia del aceite esencial de ajedrea (*Satureja montana*) en el control de la ascosferosis de la abeja (*Apis mellifera*) en condiciones de campo. *Revista Iberoamericana*, **1998**; 19–21.
- Higes** M, Sanz-López A, Llorente-Martínez J, Suarez-Robles M y Pérez-Sánchez J. Influencia del método de aplicación en la eficacia acaricida del ácido oxálico frente a *Varroa jacobsoni*. *Medicina Veterinaria*, **1998**; 15: 592-595.
- Higes** M, Martín R, Sanz A, Álvarez N, Sanz A, García P, y col. El síndrome de despoblamiento de las colmenas en España. Consideraciones sobre su origen. *Vida Apícola*. **2005**; 133: 15–21.
- Higes** M, Martín R, y Meana A. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology*. **2006**; 92(2): 93–5.
- Higes** M, García-Palencia P, Martín-Hernández R, Meana A. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology*. **2007a**; 94(3):211–7.
- Higes** M, Esperón F, Sánchez-Vizcaíno JM. Short communication. First report of black queen-cell virus detection in honey bees (*Apis mellifera*) in Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research*. **2007b**; 5(3):322–5.
- Higes** M, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, García-Palencia P, Meana A. Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology*. **2008a**; 97(1):76-8.

**Higes M**, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, Botías C, García-Palencia P, Meana A. Regurgitated pellets of *Merops apiaster* as fómites of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores. *Environmental Microbiology*. **2008b**; 10(5):1374–9.

**Higes M**, Martín-Hernández R, Botías C, Garrido-Bailón E, González-Porto AV, Barrios L, y col. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse: Natural *Nosema ceranae* infection. *Environmental Microbiology*. **2008c**; 10(10): 2659–69.

**Higes M**, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, González-Porto AV, García-Palencia P, Meana A. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in profesional apiaries. *Environmental Microbiology Reports*. **2009a**; 1(2):110–3.

**Higes M**, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, Botías C, y Meana A. The presence of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in North African honey bees (*Apis mellifera intermissa*). *Journal of Apicultural Research*, **2009b**; 48(3): 217–219.

**Higes M**, Martín-Hernández R, Martínez-Salvador A, Garrido-Bailón E, González-Porto AV, Meana A, y col. A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. *Environmental Microbiology Reports*. **2010a**; 2(2):243–50.

**Higes M**, Martín-Hernández R, Meana A. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie*. **2010b**; 41(3):375–92.

**Higes M**, García-Palencia P, Botías C, Meana A, Martín-Hernández R. The differential development of microsporidia infecting worker honey bee (*Apis mellifera*) at increasing incubation temperature. *Environmental Microbiology Reports*. **2010c**; 2(6):745–8.

**Higes M**, Meana A, Bartolomé C, Botías C, Martín-Hernández R. *Nosema ceranae* (Microsporida), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental Microbiology Reports*. **2013a**; 5:17–29.

**Higes M**, Juarranz Á, Dias-Almeida J, Lucena S, Botías C, Meana A, y col. Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports*. **2013b**; 5(4):530–6.

**Higes M**, Gómez-Moracho T, Rodríguez-García C, Botías C, Martín-Hernández R. Preliminary effect of an experimental treatment with “Nozevit®”, (a phyto-pharmacological preparation) for *Nosema ceranae* control. *Journal of Apicultural Research*. **2014**; 53(4): 472–474.

**Higes M**, Rodríguez-García C, Gómez-Moracho T, Meana A, Bartolomé C, Maside X, Barrios L, Martín-Hernández R. Short communication: Survival of honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Crithidia mellificae* (Langridge and McGhee: ATCC®30254™) in the presence of *Nosema ceranae*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, **2016**; 14: 3.

**Hirt RP**, Logsdon JM, HealyB, Dorey MW, Doolittle WF y Embley TM (1999). Microsporidia are related to fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96, **1999**; 19; 96(2): 580–585.

**Holt** HL, Aronstein KA, y Grozinger CM. Chronic parasitization by *Nosema* microsporidia causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics*, **2013**; 14: 799.

**Holt** HL, Grozinger CM. Approaches and challenges to managing *Nosema* (Microspora: Nosematidae) parasites in honey bee (Hymenoptera: apidae) colonies. Review. *Journal of Economic Entomology*, **2016**. DOI: 10.1093/jee/tow103.

**Horn** T, Boutros M. E-RNAi: a web application for the multi-species design of RNAi reagents [internet]. *Nucleic Acids Research.*; **2010**, [revisado 6 Jun 2015]. Disponible en: <http://www.dkfz.de/signaling/e-rnai3/>

**Hornitzky** M. Aspects of the ecology and treatment of honey bee infections. Tesis doctoral, University of New South Wales. **1985**.

**Hornitzky** M. Major bee diseases in Australia. *Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Diseases*, **1985**; 35: 17.

**Hornitzky** M. Commercial Use of Gamma Radiation in the Beekeeping Industry. *Journal Bee World*. **1994**; 75: 3.

**Hornitzky** M. *Nosema* Disease. Literature Review and Survey for Beekeepers [internet]. Publicación Nº 05/055. Proyecto Nº DAN-228A. Rural Industries Research and Development Corporation, NSW Department of Primary Industries, Australian Government; **2005** [revisado Oct 2016]. Disponible en: <https://rirdc.infoservices.com.au/>

**Hornitzky** M. Does *Nosema ceranae* infect bees and contaminate honey in Australia? [Internet] Publicación Nº 08/133. RIRDC Project No PRJ000885. Rural Industries Research and Development Corporation, NSW Department of Primary Industries, Australian Government; **2008** [revisado Oct 2016]. Disponible en: <https://rirdc.infoservices.com.au/>

**Huang** WF, Jiang JH, Wang CH. *Nosema ceranae* infection in *Apis mellifera*. Libro de resúmenes del congreso 38th Annual Meeting of Society for Invertebrate Pathology; **2005**, Alaska.

**Huang** WF, Bocquet M, Lee KC, Sung IH, Jiang JH, Chen YW, y Wang CH. The comparison of rDNA spacer regions of *Nosema ceranae* isolates from different hosts and locations. *Journal of Invertebrate Pathology*, **2008**; 97(1), 9–13.

**Huang** Q, Kryger P, Le Conte Y, Moritz RF. Survival and immune response of drones of a *Nosemosis* tolerant honey bee strain towards *N. ceranae* infections. *Journal of Invertebrate Pathology*. **2012**; 109(3):297-302.

**Huang** W-F, Solter LF, Yau PM, Imai BS. *Nosema ceranae* escapes fumagillin control in honey bees. *PLoS Pathogens*. **2013**; 9(3): e1003185.



**Huang Q**, Kryger P, Le Conte Y, Lattorff HMG, Kraus FB, Moritz RFA. Four quantitative trait loci associated with low *Nosema ceranae* (Microsporidia) spore load in the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie*. **2014**; 45(2):248–56.

**Huang Q**, Evans J., Identification of microRNA-like small RNAs from fungal parasite *Nosema ceranae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. **2016**; 133: 107–109.

**Ibrahim A**, Melathopoulos AP, Pernal SF. Disinfection of *Nosema ceranae* contaminated comb by irradiation, acetic acid fumigation and heat [internet]. Libro de resúmenes del congreso American bee research conference; **2010**, Orlando, Florida [revisado 6 Dic 2016]. Disponible en: <http://articles.extension.org/pages/30369/abrc2010-disinfection-of-nosema-ceranae-infected-comb-by-irradiation-acetic-acid-and-heat>

**Imdorf A**. Einwinterung der Bienenvölker, ein Kurzbericht. Herbstreizfütterung oder nein? Schweiz. Bienen-Z. **1982**; 392-394.

**Imdorf A**, Buehlmann G, Gerig L, Kilchenmann V, Wille H. Überprüfung der Schätzmethode zur Ermittlung der Brutfläche und der Anzahl Arbeiterinnen in freifliegenden Bienenvölkern. *Apidologie*. **1987**; 18: 137-146.

**Imdorf A**, Gerig L. Course in determination of colony strength. Swiss Federal Dairy Research Institute, Liebefeld CH 3003 Bern Switzerland (after L Gerig, 1983. Lehrgang zur Erfassung der Volksstärke). Schweiz BienenZeitung 106: 199204  
**Imdorf A**, Charrière JD, Gallmann P. Mögliche Ursachen für die Völkerverluste der letzten Jahre, Schweiz. Bienenztg. **2006**; 129: 6–10.

**Ingber D**, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamaru T, Brem H, Folkman J. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. *Nature*. **1990**; 348: 555–557.

**Jack CJ**, Lucas HM, Webster TC, y Sagili RR. Colony Level Prevalence and Intensity of *Nosema ceranae* in Honey Bees (*Apis mellifera* L.). *PloS One*, **2016**; 11(9): e0163522.

**Jahangir M**, Kim HK, Choi YH, Verpoorte R. Health-Affecting Compounds in Brassicaceae. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food safety*. **2009**; 8: 31-43.

**Jara L**, Muñoz I, Cepero A, Martín-Hernández R, Serrano J, Higes M, De la Rúa P..Stable genetic diversity despite parasite and pathogen spread in honey bee colonies. *The Science of Nature*. **2015**; 102 (9-10): 1298.

**Jarosch A**, y Moritz RFA. RNA interference in honeybees: off-target effects caused by dsRNA. *Apidologie*. **2012**; 43:2, 128–138.

**Jolly CE**, Leonard CA, y Hayman JR. Expression and localization of an Hsp70 protein in the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *International Journal of Microbiology*. **2010**, Article ID 523654.

**Judge AD**, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K y MacLachlan I. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nature Biotechnology*. **2005**; 23: 457-462.

- Jung** HJ, Hwang IA, Sung WS, Kang H, Kang BS, Seu YB, Lee DG. Fungicidal effect of resveratrol on human infectious fungi. *Archives of Pharmacal Research*. **2005**; 28(5): 557-60.
- Katznelson** H, Jamieson CA. Control of Nosema disease of honeybees with fumagillin. *Science*. **1952**; 115: 70–71.
- Katznelson** H, Robb JA. The use of gamma radiation from cobalt-60 in the control of diseases of the honeybee and the sterilization of honey. *Canadian Journal of Microbiology*. **1962**; 8(2): 175-179.
- Kaur** J, Tikoo K. Evaluating cell specific cytotoxicity of differentially charged silver nanoparticles. *Food and Chemical Toxicology*. **2013**; 51: 1-14.
- Keeling** PJ, Fast NM. Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annual Review Microbiology*. **2002**; 56: 93–116.
- Kim** CW, Hwang KA, Choi KC. Anti-metastatic potential of resveratrol and its metabolites by the inhibition of epithelial-mesenchymal transition, migration, and invasion of malignant cancer cells. *Phytomedicine*. **2016**; 15; 23(14): 1787-1796.
- Klee** J, Besana AM, Genersch E, Gisder S, Nanetti A, Tam DQ, y col. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*. **2007**; 96(1):1–10.
- Knobloch** K, Pauli A, Iberl N, Weigand N, y Weis HM. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*. **1989**; 1: 119–128.
- Koch** H, Schmid-Hempel P. Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. **2011**; 108: 19288–19292.
- Kralj** J, Fuchs S. *Nosema* sp. influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *Apidologie*. **2010**; 41(1):21–8.
- Krebes** L, Zeidler L, Frankowski J, Bastrop R. (Cryptic) sex in the microsporidian *Nosema granulosis*—evidence from parasite rDNA and host mitochondrial DNA. *Infection, Genetics and Evolution Journal*. **2014**; 21: 259–268.
- Kurze** C, Le Conte Y, Dussaubat C, Erler S, Kryger P, Lewkowski O, Müller T, Widder M, Moritz RF. *Nosema* Tolerant Honeybees (*Apis mellifera*) Escape Parasitic Manipulation of Apoptosis. *PLoS One*. **2015**; 7; 10(10):e0140174.
- Kurze** C, Le Conte Y, Dussaubat C, Erler S, Kryger P, Lewkowski O, Moritz RFA. *Nosema* tolerant honeybees (*A. mellifera*) escape parasitic manipulation of apoptosis. *PLoS ONE*, **2015**. 10(10): 1–9.
- Kurze** C, Mayack C, Hirche F, Stangl GI, Le Conte Y, Kryger P, Moritz RF. *Nosema* spp. infections cause no energetic stress in tolerant honeybees. *Parasitology Research*. **2016a**; 115(6):2381-8.

**Kurze C**, Routtu J, Moritz RF. Parasite resistance and tolerance in honeybees at the individual and social level. *Zoology*. **2016b**; 119(4):290-7.

**Kurze C**, Dosselli R, Grassl J, Le Conte Y, Kryger P, Baer B, Moritz RF. Differential proteomics reveals novel insights into *Nosema*-honey bee interactions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **2016c**; 23; 79:42-49.

**Ladurner E**, Bosch J, Kemp WP, and Maini S. Foraging and nesting behaviour of *Osmia lignaria* (Hymenoptera, megachilidae. in the presence of fungicides, Cage studies. *Journal of Environmental Entomology*. **2008**; 101: 647-653.

**Larrondo JV**, Agut M y Calvo-Torras MA. Antimicrobial activity of essences from labiatae. *Microbios* **1995**. 82, 171–172.

**Larsson R**. Ultrastructure, function, and classification of Microsporidia. *Progress in Protistology*. **1986**; 1:325–90.

**Lazzeri L**, Manici LM. The glucosinolate-myrosinase system: a natural and practical tool for biofumigation. *Acta Horticulturae*. **2000**; 532: 89-95

**Lazzeri L**, Leoni O, Manici LM. Biocidal plant dried pellets for biofumigation. *Industrial Crops and Products*. **2004**; 20: 59-65.

**Lazzeri L**, Leoni O, Mancini L, Palmieri S, Patalano G. Use of seed flour as soil pesticide. Patent number US7749549B2, **2010**.

**Lecocq A**, Jensen AB, Kryger P, y Nieh, JC. Parasite infection accelerates age polyethism in young honey bees. *Scientific Reports*, **2016**; e22042.

**Lee SC**, Corradi N, Byrnes III EJ, Torres-Martinez S, Dietrich FS, Keeling PJ, Heitma, J. Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi. *Current Biology* **2008**; 18:1675– 1679.

**Leiro J**, Cano E, Ubeira FM, Orallo F, Sanmartín ML. In vitro effects of resveratrol on the viability and infectivity of the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **2004**; 48(7):2497-501.

**Leiro J**, Varela M, Piazzon MC, Arranz JA, Noya M, Lamas J. The anti-inflammatory activity of the polyphenol resveratrol may be partially related to inhibition of tumour necrosis factor-alpha (TNF-a) pre-mRNA splicing. *Molecular Immunology*. **2010**; 47: 114-1120.

**Leiro J**, Piazzon C, Domínguez B, Mallo N, Lamas J. Evaluation of some physical and chemical treatments for inactivating microsporidian spores isolated from fish. *International Journal of Food Microbiology*. **2012**; 156: 152–160.

**Li W**, Evans JD, Huang Q, Rodríguez-García C, Liu J, Hamilton M, Grozinger CM, Webster TC, Su S, Chen YP. Silencing the honey bee (*Apis mellifera*) naked cuticle gene (*nkd*) improves host immune function and reduces *Nosema ceranae* infections. *Applied of Environmental Microbiology*. **2016**; 82:6779–6787.

- Liu TP.** Ultrastructure of the midgut of the worker honeybee *Apis mellifera* heavily infected with *Nosema apis*. *Journal of Invertebrate Pathology*. **1984**; 44(3):282–91.
- Liu TP.** Ultrastructural changes in the secretion granules of the hypopharyngeal glands of the honeybee infected by *Nosema apis* and after treatment with fumagillin. *Tissue Cell*. **1990**; 22(4):523–31.
- Liu X, Zhang Y, Yan X y col.** Prevention of chinese sacbrood virus infection in *Apis cerana* using RNA interference. *Current Microbiology*. **2010**; 61: 422.
- Liu C, Wang L, Wang J, Wu B, Liu W, Fan P, Liang Z, Li S.** Resveratrol in Vitis berry skins and leaves: their extraction and analysis by HPLC. *Food Chemistry*. **2013**; 136:643–649.
- Lotmar R.** Der Eiweiss-Stoffwechsel im Bienenvolk (*Apis mellifica*) während der Überwinterung. *Landwirtschaftl Jb der Schweiz*. **1939**; 53:33–71.
- Lundgren JG, y Duan JJ.** RNAi-based insecticidal crops: potential effects on nontarget species. *BioScience*. **2013**; 63: 657–665.
- Luna-Olivares G, Chávez-Hernández E, Rodríguez Dehaibes SR.** Vida apícola: revista de apicultura, **2016**; 195: 40-41.
- Maggi M, Negri P, Plischuk S, Szawarski N, De Piano F, De Feudis L, Eguaras M, Audisio C.** Effects of the organic acids produced by a lactic acid bacterium in *Apis mellifera* colony development, *Nosema ceranae* control and fumagillin efficiency. *Veterinary Microbiology*. **2013**; 167 (3-4):474-83.
- MAGRAMA** - Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente [Internet]. Gobierno de España; **2013** [citado 8 Jun 2015]. Disponible en: <http://www.magrama.gob.es/es/>
- Maistrello L, Lodesani M, Costa C, Leonardi F, Marani G, y col.** Screening of natural compounds for the control of nosema disease in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*. **2008**, 39 (4): 436-445.
- Malone LA, Gatehouse HS, Tregidga EL.** Effects of time, temperature, and honey on *Nosema apis* (Microsporidia: Nosematidae), a parasite of the honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. **2001**; 77: 258– 268.
- Maori E, Paldi N, Shafir S, Kalev H, Tsur E, Glick E, Sela I.** IAPV, a bee-affecting virus associated with Colony Collapse Disorder can be silenced by dsRNA ingestion. *Insect Molecular Biology*. **2009**; 8(1):55-60.
- Martín-Blanco V.** Cinética y mecanismos del edema celular osmótico producido por amoníaco y amonio en células de neuroblastoma. **2004**. Tesis doctoral. Universidad Pablo de Olavide, Argentina.
- Martín-Hernández R, Meana A, Prieto L, Martínez-Salvador A, Garrido-Bailón E, Higes M.** Outcome of colonization of *A. mellifera* by *N. ceranae*. *Applied Environmental Microbiology*. **2007**; 73(20):6331–8.

**Martín-Hernández** R, Meana A, García-Palencia P, Marín P, Botías C, Garrido-Bailón E, Higes M. Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *Applied Environmental Microbiology*. **2009**; 75(8):2554–7.

**Martín-Hernández** R, Botías C, Garrido-Bailón E, Martínez-Salvador A, Prieto L, Meana A. Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environmental Microbiology*. **2012**; 14 (8):2127–38.

**Martín-Hernández** R, Higes M, Sagastume S, Juarranz A, Dias-Almeida J, Budge GE, Meana A, Boonham N. Microsporidia infection impacts the host cell's cycle and reduces host cell apoptosis. *Plos One*, **2017**; 12(2): e0170183.

**Maside** X, Gómez-Moracho T, Jara L, Martín-Hernández R, De la Rúa P, Higes M, y col. Population Genetics of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*: One Host (*Apis mellifera*) and Two Different Histories. *PLoS ONE* **2015**; 10(12): e0145609.

**Mátray** enikő S, Livia H, Dénes H, Attila A, László B. Comparison of Fumagillin and Nonosz® against *N. ceranae* nosemosis of the honeybee (*Apis mellifera* L.) [internet]. Hill's pet nutrition; **2011** [revisado 12 Dic 16]. Disponible en: <http://www.hillspet.hu/mehesz/vizsgalat.php>

**Maurizio** A. The influence of pollen feeding and brood rearing on the length of life and physiological conditions of the honeybee. *Bee World*. **1950**; 31(2): 9–12.

**Mayack** C, Natsopoulou ME, McMahon DP. *Nosema ceranae* alters a highly conserved hormonal stress pathway in honeybees. *Insect Molecular Biology*. **2015**; 24(6): 662-70.

**McCowen** MC, Callender ME, Lawlis JF. Fumagillin (H-3) a new antibiotic with amebicidal properties, *Science* **1951**; 113: 202–203.

**McDonnell** CM, Alaux C, Parrinello H, Desvignes J-P, Crauser D, Durbesson E, y col. Ectoand endoparasite induce similar chemical and brain neurogenomic responses in the honey bee (*Apis mellifera*). *BMC Ecology*. **2013**; 13(1):25

**McMeanmin** AJ, y Genersch E. Honey bee colony losses and associated viruses. *Current opinion in insect science* **2015**; 8: 121-129.

**Meana** A, Martín-Hernández R, Higes M. The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees. *Journal Apiculture Research Bee World*. **2010**; 49(2):212–4

**Medici** SK., Sarlo EG, Porrini MP, Braunstein M, y Eguaras MJ. Genetic variation and widespread dispersal of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* apiaries from Argentina. *Parasitology Research*. **2012**; 110(2): 859–864.

**Meeus** I, De Graaf DC, Jans K, Smagghe G. Multiplex PCR detection of slowly-evolving trypanosomatids and neogregarines in bumblebees using broad-range primers. *Journal Applied Microbiology*. **2010**; 109(1):107–15.

**Meeus** I, Brown MJF, De Graaf DC, Smagghe G. Effects of invasive parasites on bumble bee declines. *Conservation Biology*. **2011**; 25(4): 662–71.

**Meikle** WG, Mercadier G, Holst N, Nansen C, Girod V: Impact of a treatment of *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) on honeybee (*Apis mellifera*) colony health and on *Varroa destructor* mites (Acari: Varroidae). *Apidologie*. **2008**; 39:247–259.

**Michalczyk** M, Sokół R, Szczerba- Turek A, Banczerz-Kisiel A. A comparison of effectiveness of the microscopic and multiplex PCR method in identifying and discriminating the species of *Nosema spp.* spores in worker bees (*Apis mellifera*) from winter hive debris. *Polish Journal of Veterinary Science*, **2011**; 14: 385-391.

**Michalczyk** M, sokół R, Koziatsek S. Evaluation of the effectiveness of selected treatments of nosema spp. Infection by the hemocytometric method and duplex PCR. *Acta Veterinaria-Beograd* **2016**; 66 (1): 115-124.

**Milbrath** MO, van Tran T, Huang WF, Solter LF, Tarpy DR, Lawrence F, y Huang ZY. Comparative virulence and competition between *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, **2015**; 125: 9–15.

**Miranda** JR, Genersch E. Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology*. **2010**; 103(1): S48–S61.

**Moeller** FE. *Nosema* disease – its control in honey bee colonies [internet]. Washington (EEUU): Department of Agricultural Technical Bulletin no 1569; **1978** [citado Abr 1978]. Disponible en: <https://naldc.nal.usda.gov/naldc/download.xhtml?id=CAT87201459&content=PDF>

**Molina** JM, Tourneur M, Sarfati C, Chevret S, de Gouvello A, Gobert JG, Balkan S, Derouin F; Agence Nationale de Recherches sur le SIDA 090 Study Group. Fumagillin treatment of intestinal microsporidiosis. *New England Journal of Medicine*. **2002**; 346(25):1963-9.

**Morgenthaler** O, Die Keimung der Nosemasporen. *Siidwestdtsch. Imker*, **1963**; 1:, 102 104.

**Mourad** AK, Zaghloul OA, Kady EL, Nemat FM, Morsy ME. A novel approach for the management of the chalkbrood disease infesting honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) colonies in Egypt. *Commun. Agricultural and Applied Biological Science*. **2005**; 70 (4): 601–611.

**Muñoz** I, Cepero A, Pinto MA, Martín-Hernández R, Higes M., y De la Rúa P. Presence of *Nosema ceranae* associated with honeybee queen *introductions*. *Infection, Genetics and Evolution*, **2014**; 23: 161–168.

**Nanetti** A, Stradi G. Varroasi: tratta- mento chimico con acido ossalico in sciroppo zuccherino. *L'Ape Nostra Amica*. **1997**; 5: 6–14.

**Nanetti** A. ApiHerb as an alternative product to treat *Nosema* infection. Proc. Workshop “Nosema disease: lack of knowledge and work standardization” [internet]; Coloss (COST Action FA0803); **2009**

[revisado 10 Dic 2015]. Disponible en:

<http://www.coloss.org/news/nosemaworkshopproceedingsonline>.

**Nanetti A**, Martín-Hernández R, Gómez-Moracho T, Higes M. Api-Herb en el control orgánico de la Nosemosis tipo C (*Nosema ceranae*, Microsporidia) [internet]. Libro de resúmenes del III Congreso Ibérico de Apicultura; **2014**, Mirandela, Portugal [revisado 10 Mar 2017]. Disponible en: <http://www.esa.ipb.pt/cia2014/images/apr/Nanettietal.pdf>

**Nanetti A**, Rodríguez-García C, Meana A, Martín-Hernández R, Higes M. Effect of oxalic acid on *Nosema ceranae* infection. Research Veterinary Science. **2015**; 102: 167-172.

**Natsopoulou ME**, McMahon DP, Doublet V, Bryden J, Paxton RJ. Interspecific competition in honeybee intracellular gut parasites is asymmetric and favours the spread of an emerging infectious disease. Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences. **2015**; 282(1798):20141896.

**Naug D**. Infected honeybee foragers incur a higher loss in efficiency than in the rate of energetic gain. Biology Letters. **2014**; 10(11):20140731.

**Neira M**. Problemas de la nosemosis en Chile: factores predisponentes y estrategias para el manejo de la enfermedad. En: IV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología Apícola Facultad de Agronomía Universidad Católica de Valparaíso; **1994**; 1-14.

**Nelson CM**, Ihle KE, Fondrk MK, Page RE, y Amdam GV. The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. PLoS Biology, **2007**; 5(3): 0673–0677.

**Nielsen SL**, Nicolaisen M, Kryger P: Incidence of acute bee paralysis virus, black queen cell virus, chronic bee paralysis virus, deformed wing virus, Kashmir bee virus and sacbrood virus in honey bees (*Apis mellifera*) in Denmark. Apidologie **2008**; 39: 310-314.

**Ninan N**, Forget A, Shastri VP, Voelcker NH, Blencowe A. Anti-bacterial and anti-inflammatory pH-responsive tannic acid carboxylated agarose composite hydrogels for wound healing, ACS Appl. Mater. Interfaces, **2016**; 8 (42):28511–28521.

**Niu JH**, Jian H, Xu J, Chen C, Guo Q. RNAi silencing of the *Meloidogyne incognita* Rpn7 gene reduces nematode parasitic success. European Journal of Plant Pathology. **2012**; 134, 131–144.

**Niu J**, Meeus I, Cappelle K, Piot N, Smagghe G. The immune response of the small interfering RNA pathway in the defense against bee viruses. Current Opinion in Insect Science, **2014**; 6: 22-27.

**Nordström S**, Fries I, Aarhus A, Hansen H y Korpela S. Virus infections in Nordic honey bee colonies with no, low or severe *Varroa Jacobsoni* infestations. Apidologie **1999**; 30: 475–484.

**Nozal MJ**, Bernal JL, Martín MT, Bernal J, Álvaro A, Martín-Hernández R, Higes M. Trace analysis of fumagillin in honey by liquid chromatography-DAD-electrospray ionization mass spectrometry. Journal of Chromatography. A. **2008**; 1190: 224–231.

**Nunes** FMF, Aleixo AC, Barchuk AR, Bomtorin AD, Grozinger CM, y Simoes ZLP. Non-target effects of green fluorescent protein (GFP)-derived double-stranded RNA (dsRNA-GFP) used in honey bee RNA interference (RNAi) assays. *Insects*. **2013**; 4-1: 90–103.

**O'Mahony** EM, Tay WT, Paxton RJ. Multiple rRNA variants in a single spore of the microsporidian *Nosema bombi*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **2007**; 54: 103–109.

**OECD 213** - Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Test No. 213: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test [internet]. OECD; **1998** [citado 21 Sep 1998]. Disponible en: <http://www.oecd-ilibrary.org/>

**OECD 214** - Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Test No. 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test [internet]. OECD; **1998** [citado 21 Sep 1998]. Disponible en: <http://www.oecd-ilibrary.org/>

**OIE** - World Organisation for Animal Health. Chapter 2.2.4 [internet]. Nosemosis of honey bees Terrestrial Manual; **2008** [citado 9 Oct 2015]. Disponible en: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.02.04\\_NOSEMOSIS.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.04_NOSEMOSIS.pdf)

**OIE** - World Organisation for Animal Health. Capítulo 2.2.4 [internet]. Nosemosis de las abejas melíferas. Terrestrial Manual; **2013** [citado 9 Oct 2015]. Disponible en: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/2.02.04\\_NOSEMOSIS\\_FINAL.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.02.04_NOSEMOSIS_FINAL.pdf)

**Omidbakhsh** N. Evaluation of sporicidal activities of selected environmental surface disinfectants: Carrier tests with the spores of *Clostridium difficile* and its surrogates [internet]. Department of Open Innovation and Intellectual Property, Virox Technologies Inc., **2010** [citado 27 Oct 2010]. Disponible en: [http://info.virox.com/hs-fs/hub/241248/file-481912618-pdf/Surfaces-PRS/Evaluation\\_Navid.pdf?t=1489208493053](http://info.virox.com/hs-fs/hub/241248/file-481912618-pdf/Surfaces-PRS/Evaluation_Navid.pdf?t=1489208493053).

**Pacini** A, Mira A, Molineri A, Giacobino A, Bulacio Cagnolo N, Aignasse A, Zago L, Izaguirre M, Merke J, Orellano E, Bertozzi E, Pietronave H, Russo R, Scannapieco A, Lanzavecchia S, Schnittger L, Signorini M. Distribution and prevalence of *Nosema apis* and *N. ceranae* in temperate and subtropical eco-regions of Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology*. **2016**; 141:34-37.

**Pacini** A, Giacobino A, Molineri A, Bulacio Cagnolo N, Aignasse A, Zago L, Mira A, Izaguirre M, Schnittger L, Merke J, Orellano E, Bertozzi E, Pietronave H y Signorini M. Risk factors associated with the abundance of *Nosema spp.* in apiaries located in temperate and subtropical conditions after honey harvest. *Journal of Apicultural*. **2016**; 55-4: 342-350.

**Paldi** N, Glick E, Oliva M, Zilberberg Y, Aubin L, Pettis JS, Chen YP, Evans JD. Effective gene silencing of a microsporidian parasite associated with honey bee (*Apis mellifera*) colony declines. *Applied of Environmental Microbiology*. **2010**; 76: 5960–5964.

**Paxton** R, Klee J, Korpela S, Fries I. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie*. **2007**; 38-6:558.

**Peng** G, Kashio M, Morimoto T, Li T, Zhu J, Tominaga M, y Kadowaki T. Plant-Derived Tick Repellents Activate the Honey Bee Ectoparasitic Mite TRPA1. *Cell Reports*. **2015**; 12(2): 190–202.



**Peng Y.** Consequences of *N. apis* infection for male honey bees and their fertility. *Science reports*, **2015**; 5: 1-5.

**Pernal SF, Ibrahim A, Melathopoulos AP.** Disinfection of *Nosema ceranae* contaminated comb by irradiation, acetic acid fumigation and heat [internet]. Proceedings American bee research conference (Florida); **2010** [revisado 9 Dic 2016]. Disponible en: <http://articles.extension.org/pages/30369/abrc2010-disinfection-of-nosema-ceranae-infected-comb-by-irradiation-acetic-acid-and-heat>

**Pettis JS, Collins AM, Wilbanks R, Feldlaufer MF.** Effects of coumaphos on queen rearing in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*. **2004**; 35: 605–610.

**Pettis JS.** A scientific note on *Varroa destructor* resistance to coumaphos in the United States. *Apidologie*. **2004**; 35: 91–92.

**Peyretilade E, Broussolle V, Peyret P, Metenier G, Gouy M. y Vivares CP.** Microsporidia, amitochondrial protists, possess a 70-kDa heat shock protein gene of mitochondrial evolutionary origin. *Molecular Biology and Evolution*. **1998**; 15: 683–689.

**Plischuk S, Martín-Hernández R, Prieto L, Lucía M, Botías C, Meana A, Abrahamovich AH, Lange C y Higes M.** South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports*. **2009**; 1: 131–135.

**Porrini MP, Fernández NJ, Garrido PM, Gende LB, Medici SK, Eguaras MJ.** In vivo evaluation of antiparasitic activity of plant extracts on *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Apidologie*. **2011**; 42 (6): 700–707.

**Proaño-Coello LF, Naranjo-Puente B, Ulloa-Cortazar S y Ron-Román J.** Evaluación de la toxicidad de ácido oxálico, aceite esencial de eucalipto y amitraz en abejas adultas (*Apis mellifera*) infectadas con el ácaro *Varroa* spp. [Internet]. Congreso en IX Congreso de Ciencia y tecnología ESPE **2014** [revisado 15 Ene 2017]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Jorge\\_Ron-Roman/publications](https://www.researchgate.net/profile/Jorge_Ron-Roman/publications)

**Ptaszyńska AA, Borsuk G, Woźniakowski G, Gnat S, y Małek W.** Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid detection and differentiation of *Nosema apis* and *N. ceranae* in honeybees. *FEMS Microbiology Letters*. **2014**; 357(1): 40–48.

**Rascón B, Hubbard BP, Sinclair DA, Amdam GV.** The lifespan extension effects of resveratrol are conserved in the honey bee and may be driven by a mechanism related to caloric restriction. *Aging*. **2012**; 4:499-508.

**Ravoet J, De Smet L, Meeus I, Smagghe G, Wenseleers T, y de Graaf DC.** Widespread occurrence of honey bee pathogens in solitary bees. *Journal of Invertebrate Pathology*. **2014**; 122: 55–58.

**Ravoet J, Schwarz RS, Descamps T, Yañez O, Tozkar CO, Martín-Hernández R, Bartolomé C, De Smet L, Higes M, Wenseleers T, Schmid-Hempel R, Neumann P, Kadowaki T, Evans JD, de Graaf DC.** Differential

diagnosis of the honey bee trypanosomatids; *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim*. Journal of Invertebrate Pathology. **2015**; 130:21-7.

Reglamento de ejecución (CEE) No **2377/90** DEL CONSEJO de 26 de junio de 1990 por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los **alimentos de origen animal** (LMR-Taninum) [internet]. Diario Oficial de las Comunidades Europeas; **1990** [citado 18 Sep 1990], (revisado 12 Dic 2016). Disponible en: [http://www.ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg\\_1990\\_2377/reg\\_1990\\_2377\\_es.pdf](http://www.ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg_1990_2377/reg_1990_2377_es.pdf).

Reglamento (UE) **2016/1190** DE LA COMISIÓN de 19 de julio de 2016 por la que se autoriza la comercialización de **trans-resveratrol** como nuevo ingrediente alimentario con arreglo al Reglamento (CE) n.º 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo (Resveratrol). Diario Oficial de la Unión Europea; **2016** [citado 21 Jul 2016], (revisado 12 Dic 2016). Disponible en: [http://acsa.suportserveis.com/uploads/dispositions/decision\\_1190\\_douel196\\_210716\\_trans\\_resveratrol\\_reg258\\_nous\\_aliments.pdf](http://acsa.suportserveis.com/uploads/dispositions/decision_1190_douel196_210716_trans_resveratrol_reg258_nous_aliments.pdf)

Reglamento (CE) No **205/2006** DE LA COMISIÓN de 6 de febrero de 2006 por el que se modifican, en lo referente al **toltrazuril**, el éter monoetílico de dietilenoglicol y el monooleato de sorbitán olixietilenado, los anexos I y II del Reglamento (CEE) no 2377/90 del Consejo, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal (Toltrazuril) [internet]. Diario Oficial de la Unión Europea; **2006** [citado 7 Feb 2006], [revisado 12 Dic 2016]. Disponible en: [www.agrodigital.com/upload/l\\_03420060207es00210023\[2\].pdf](http://www.agrodigital.com/upload/l_03420060207es00210023[2].pdf)

**Ren A**, Zhang W, Thomas HG, Barish A, Berry S, Kiel JS, Naren AP. A Tannic Acid-based Medical Food, Cesinex®. Exhibits Broad-spectrum Antidiarrheal Properties: a Mechanistic and Clinical Study. Digestive Diseases and Sciences. **2012**; 57(1): 99–108.

**Reynaldi FJ**, De Giusti MR, Alippi AM. Inhibition of the growth of *Ascosphaera apis* by *Bacillus* and *Paenibacillus* strains isolated from honey. Revista Argentina de Microbiología. **2004**; 36: 52–55.

**Rivière MP**, Ribière M, y Chauzat MP. Recent molecular biology methods for foulbrood and noseamosis diagnosis. Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics). **2013**; 32(3): 885–92.

**Roberts KE**, Evison SE, Baer B, Hughes WO. The cost of promiscuity: sexual transmission of *Nosema* microsporidian parasites in polyandrous honey bees. Scientific Reports. **2015**; 30 (5):10982.

**Robinson GE**, Vargo EL. Juvenile hormone in adult eusocial Hymenoptera: gonadotropin and behavioral pacemaker. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. **1997**; 35: 559–583.

**Rodríguez E**, De La Riva A, Mattiello R. Evaluación del Toltrazuril para el tratamiento de la nosemosis de la abeja melífera. Revista infovet, Facultad de ciencias veterinarias-UBA, **2009**.

**Rodríguez-Ferri E**. Desinfección de superficies ganaderas [Internet]. Universidad de León, departamento de Sanidad Animal; **2013** (revisado 01.02.2017). Disponible en:

<http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/12357/articulos-otros-temas/desinfeccion-en-las-explotaciones-ganaderas.html> 2013

**Roudel M**, Aufauvre J, Corbara B, Delbac F, y Blot N. New insights on the genetic diversity of the honeybee parasite *Nosema ceranae* based on multilocus sequence analysis. *Parasitology*. **2013**; 140(11): 1346–56.

**Rueda J**, Amigot Lázaro JA, y Ducha J. Evaluación de desinfectantes de amonio cuaternario sobre cepas bacterianas de origen animal. Laboratorio de microbiología, facultad de veterinaria de zaragoza. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. **2003**; 22 (3): 1097-1104.

**Runckel C**, Flenniken ML, Engel JC, Ruby JG, Ganem D, Andino R, Derisi JL. Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PLoS ONE* **2011**; 6 (6).

**Sagastume S**, del Águila C, Martín-Hernández R, Higes M, Henriques-Gil N. Polymorphism and recombination for rDNA in the putatively asexual microsporidian *Nosema ceranae*, a pathogen of honeybees. *Environmental Microbiology*. **2011**; 13:84–95.

**Sagastume S**, Martín-Hernández R, and Higes M, Henriques-Gil N. Ribosomal gene polymorphism in small genomes: analysis of different 16S rRNA sequences expressed in the honeybee parasite *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Eukaryotic Microbiology*. **2014**; 61 (1):42-50.

**Sagastume S**. Dinamismo evolutivo en genomas reducidos: análisis genético molecular del microsporidio *Nosema ceranae*. Universidad Complutense de Madrid, Tesis Doctoral, **2015**.

**Sagastume S**, Martín-Hernández R, Higes M, Henriques-Gil N. Genotype diversity in the honey bee parasite *Nosema ceranae*: multi-strain isolates, cryptic sex or both? *BMC Evolutionary Biology*. **2016**; 18: 16(1), 216.

**Sánchez-Collado JG**, Higes M, Barrio L, y Martín-Hernández R. Flow cytometry analysis of *Nosema* species to assess spore viability and longevity. *Parasitology Research*. **2014**; 113(5): 1695–701.

**Santoro KR**, Vieira MEQ, Queiroz ML, Queiroz MC, Barbosa SBP. Effect of *Stryphnodendron* spp. Tanino on *Apis mellifera* L. (Africanized bees) longevity. *Archivos de Zootecnia*. **2004**; 53: 281-291.

**Schmahl G**, Toukhy A, Ghaffar FA. Transmission electron microscopic studies on the effects of toltrazuril on *Glugea anomala*, Moniez, 1887 (Microsporidia) infecting the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Parasitology Research*. **1990**; 76(8):700-6.

**Schmid-Hempel P**. Infection and colony variability in social insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*. **1994**; 346:313–321.

**Schneider CW**, Tautz J, Grünwald B, Fuchs S. Tracking of sublethal effects of two Neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PLoS One*. **2012**; 7(1):e30023.

**Schwarz** RS, Bauchan GR, Murphy CA, Ravoet J, de Graaf DC, Evans JD. Characterization of Two Species of Trypanosomatidae from the Honey Bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. **2015**; 62(5):567-83.

**Schwarz** RS, Evans JD. Single and mixed-species trypanosome and microsporidio infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honey bees. *Developmental and Comparative Immunology*. **2013**; 40(3-4):300-10.

**Shang** X, Wang Y, Zhou X, Guo X, Dong S, Wang D, Zhang J, Pan H, Zhang Y, Miao X. Acaricidal activity of oregano oil and its major component, carvacrol, thymol and p-cymene against *Psoroptes cuniculi* in vitro and in vivo. *Veterinary Parasitology*. **2016**; 226:93-6.

**Shumkova** R, Zhelyazkova I. Effect of the feeding of products stimulating the development of bee colonies. *Nutrition and physiology. Agricultural science and technology*. **2013**; 5: 3.

**Silva** JC, Almeida JR, Quintans JS, Gopalsamy RG, Shanmugam S, Serafini MR, Oliveira MR, Silva BA, Martins AO, Castro FF, Menezes IR, Coutinho HD, Oliveira RC, Thangaraj P, Araújo AA, Quintans- Júnior LJ. Enhancement of orofacial antinociceptive effect of carvacrol, a monoterpene present in oregano and thyme oils, by  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex in mice. *Biomedical Pharmacotherapy*. **2016**; 26; 84: 454-461.

**Simeunovic** P, Stevanovic J, Cirkovic D, Radojicic S, Lakic N, Stanisic L, Stanimirovic Z. *Nosema ceranae* and queen age influence the reproduction and productivity of the honey bee colony. *Journal of Apiculture Research*. **2014**; 53:545-554.

**Simone** M, Evans JD, Spivak M. Resin collection and social immunity in honey bees. *Evolution*. **2009**; 63(11):3016-22.

**Smart** MD, Sheppard WS: *Nosema ceranae* in age cohorts of the western honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*. **2012**; 109:148–151

**Smith** ML. The honey bee parasite *Nosema ceranae*: Transmissible via food exchange? *PLoS ONE*, **2012**; 7(8).

**Soroker** V., Hetzroni A., Yakobson B. David D, David A, Voet H, Slabezki Y, Efrat H, Levski S, Kamer Y, Klinberg E, Zion N, Inbar S, Chejanovsky N. Evaluation of colony losses in Israel in relation to the incidence of pathogens and pests *Apidologie*. **2011**; 42: 192.

**Soto** ME, Bernal J, Martín MT, Higes M, Bernal JL, Nozal MJ. Liquid chromatographic determination of resveratrol and piceid isomers in honey. *Food Anal Methods* **2012**; 5:162–171.

**Stanimirovic** Z, Pejin II, Kulisic Z, Djiporovic M. Evaluation of genotoxic effects of fumagillin by sister chromatide exchange and chromosomal aberration tests in human cell cultures. *Acta Veterinaria (Beograd)*. **2007**; 57(2-3): 257-273.

**Stevanovic J**, Stanimirovic Z, Genersch E, Kovacevic SR, Ljubenkovic J, Radakovic M, y col. Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie*. **2011**; 42(1):49–58.

**Stevanovic J**, Simeunovic P, Gajic B, Lakic N, Radovic D, Fries I, y col. Characteristics of *Nosema ceranae* infection in Serbian honey bee colonies. *Apidologie*. **2013**; 44(5):522–36.

**Stevanovic J**, Schwarz RS, Vejnovic B, Evans JD, Irwin RE, Glavinic U, Stanimirovic Z. Species-specific diagnostics of *A. mellifera* trypanosomatids: A nine-year survey (2007-2015) for trypanosomatids and microsporidians in Serbian honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*. **2016**; 139:6-11.

**Suwannapong G**, Maksong S, Seanbualuang P, y Benbow ME. Experimental infection of red dwarf honeybee, *Apis florea*, with *Nosema ceranae*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. **2010**; 13(4):361–364.

**Takvorian PM**, Cali A. Polar tube formation and nucleoside diphosphatase activity in the microsporidian, *Glugea stephani*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. **1996**; 43(5):102S-103S.

**Talalay P**, Zhang Y. Chemoprotection against cancer by isothiocyanates and glucosinolates. *Biochemical Society Transactions*. **1996**; 24(3):806-10.

**Tapaszti Z**, Forgách P, Kövágó C, Békési L, Bakonyi T, Rusvai M. First detection and dominance of *Nosema ceranae* in Hungarian honeybee colonies. *Acta Veterinaria Hungarica*. **2009**; 57(3):383–8.

**Tay WT**, O'Mahony EM, Paxton RJ. Complete rRNA gene sequences reveal that the microsporidium *Nosema bombi* infects diverse bumblebee (*Bombus spp.*) hosts and contains multiple polymorphic sites. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. **2005**; 52:505–513.

**Tentcheva D**, Gauthier L, Zappulla N, Dainat B, Cousserans F, Colin MF, Bergon M. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Applied of Environmental Microbiology*. **2004**; 70: 7185–7191.

**Tino AB**, Chitcholtan K, Sykes PH, Garrill A. Resveratrol and acetyl-resveratrol modulate activity of VEGF and IL-8 in ovarian cancer cell aggregates via attenuation of the NF-κB protein. *Journal of Ovarian Research*. **2016**; 9(1):84.

**Tomaszweska B**. Alterations in the levels of some components of haemolymph in honeybees infected with *Nosema apis*. *Pszczelnictwo Zeszyty Naukowe*. **1979**; 23: 181-207.

**Traver BE** y Fell RD. Prevalence and infection intensity of *Nosema* in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Virginia. *Journal of Invertebrate Pathology*, **2011**; 107(1): 43–49.

**Traver BE**, Fell RD. Low natural levels of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* queens. *Journal of Invertebrate Pathology*. **2012**; 10: 408–410.

**Truchado P**, Tourn E, Gallez LM, Moreno DA, Ferreres F, Tomás-Barberán FA. Identification of botanical biomarkers in Argentinean Diplotaxis honeys: flavonoids and glucosinolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**; 58(24):12678-85.

- Tsagkarakis** A, Rokkas C, Katsimpoulas I. Experimental treatment with the natural water acidifier Provigoro® for *Nosema* spp. Control: preliminary results. *Advances in entomology*, **2015**; 3: 83– 85.
- Untergasser** A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. **2012**; 40:e115.
- Urbieto** A, Higes M, Meana A, Martín-Hernández R. Niveles de infección de *Nosema ceranae* en pupas de *Apis mellifera iberiensis* en infecciones naturales en España. Libro de resúmenes del Congreso ibérico de Salamanca, 8-10 Abril, **2016**.
- Valera** F, Martín-Hernández R, y Higes M. Evaluation of large-scale dissemination of *Nosema ceranae* spores by European bee-eaters *Merops apiaster*. *Environmental Microbiology Reports*, **2011**; 3(1); 47–53.
- Van Ampting** MT, Schonewille AJ, Vink C, Brummer RJ, van der Meer R, Bovee-Oudenhoven IM. Damage to the intestinal epithelial barrier by antibiotic pretreatment of salmonella-infected rats is lessened by dietary calcium or tannic acid. *Journal of Nutrition*. **2010**; 140: 2167–2172.
- Van der Zee** R, Pisa L, Andonov S, Brodschneider R, Charrière J-D, Chlebo R, y col. Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008–9 and 2009– 10. *Journal of Apiculture Research*. **2012**; 51(1):100–14.
- Van Engelsdorp** D, Meixner MD. A historical review of managed honeybee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*. **2010**; 103:S80–S95.
- Van den Heever** JP, Thompson TS, Curtis JM, Ibrahim A y Pernal S. Fumagillin: An Overview of Recent Scientific Advances and Their Significance for Apiculture. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **2014**; 62(13): 2728–2737.
- Van den Heever**, JP, Thompson, TS, Otto, SGJ y col. Evaluation of Fumagilin-B® and other potential alternative chemotherapies against *Nosema ceranae*-infected honeybees (*Apis mellifera*) in cage trial assays. *Apidologie* **2016**; 47: 617
- Van Laere**, O. Estudio de los factores que inXuyen en la germinación de las esporas de *Nosema apis* Zander. In: Colibaba, S. (Ed.), *Apimondia Symposium of Bee Biology and Pathology*. Merelbeke, Belgium, **1976**; pp. 73–76
- Vásquez** A, Forsgren E, Fries I, Paxton RJ, Flaberg E, Szekely L, y col. Correction: Symbionts as Major Modulators of Insect Health: Lactic Acid Bacteria and Honeybees. *PLoS ONE* **2012**; 7(7): 10.
- Vidau** C, Panek J, Texier C, Biron DG, Belzunces LP, Le Gall M, El Alaoui H. Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae*-infected honeybees reveals manipulation of key host functions. *Journal of Invertebrate Pathology*. **2014**; 121, 89–96.

**Vig** AP, Rampal G, Thind TS, y Arora S. Bio-protective effects of glucosinolatos. A review. LWT Food Science and Technology. **2009**; 42, 1561-1572.

**Villa** JD, Bourgeois AL, Danka RG. Negative evidence for effects of genetic origin of bees on *Nosema ceranae*, positive evidence for effects of *N. ceranae* on bees. Apidologie. **2013**; 44(5):511-8.

**Wang** DI, Moeller FE. Histological comparisons of the development of the hypopharyngeal glands in healthy and Nosema-infected worker honey bees. Journal of Economic Entomology. **1969**; 14: 135–142.

**Webster** TC. Effects of fumagillin on *Nosema apis* and honey bees (Hymenoptera: Apidae). Journal of Economic Entomology. **1994**; 87: 601–601.

**Weiskirchen** S, Weiskirchen R. Resveratrol: How Much Wine Do You Have to Drink to Stay Healthy? Advances in Nutrition. **2016**; 7(4):706-18.

**Williams** GR, Shafer AB, Rogers RE, Shutler D, Stewart DT. First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA. Journal of Invertebrate Pathology. **2008a**; 97(2):189-92.

**Williams** GR, Sampson MA, Shutler D, Rogers RE. Does fumagillin control the recently detected invasive parasite *Nosema ceranae* in western honey bees (*Apis mellifera*)? Journal of Invertebrate Pathology. **2008b**; 99(3):342-4.

**Williams** GR, Shutler D, Rogers RE. Effects at Nearctic north-temperate latitudes of indoor versus outdoor overwintering on the microsporidium *Nosema ceranae* and western honey bees (*Apis mellifera*). Journal of Invertebrate Pathology. **2010a**; 104(1):4-7.

**Williams** GR, Tarpy DR, vanEngelsdorp D, Chauzat MP, Cox-Foster DL, Delaplane KS, Neumann P, Pettis JS, Rogers RE, Shutler D. Colony Collapse Disorder in context. Bioessays. **2010b**; 32(10):845-6.

**Williams** GR, Shutler D, Burgher-MacLellan KL, Rogers REL Infra-Population and -Community Dynamics of the Parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, and Consequences for Honey Bee (*Apis mellifera*) Hosts. PLoS ONE, **2014**; 9(7).

**Wittner** M y Weiss LM. The Microsporidia and Microsporidiosis. ASM Press, Washington, DC, USA. **1999**; 110p.

**Wolf** S, McMahon DP, Lim KS, Pull CD, Clark SJ, Paxton RJ, y col. So near and yet so far: Harmonic radar reveals reduced homing ability of *Nosema* infected honeybees. PLoS One. **2014**; 9(8):e103989.

**Wolk** DM, Johnson CH, Rice EW, Marshall MM, Grahn KF, Plummer CB, y Sterling CR. A spore counting method and cell culture model for chlorine disinfection studies of *Encephalitozoon syn. Septata intestinalis*. Applied of Environmental Microbiology. **2000**; 66:1266–1273.

**Xu** Y, y Weiss LM. The microsporidian polar tube: A highly specialised invasion organelle. International Journal of Parasitology. **2005**; 35(9): 941–953.

- Yang** D, Dang X, Peng P, Long M, Ma C, Qin JJ, Wu H, Liu T, Zhou X, Pan G, Zhou Z. NbHSWP11, a microsporidia *Nosema bombycis* protein, localizing in the spore wall and membranes, reduces spore adherence to host cell. *BME, Journal Parasitology*. **2014**; 100(5):623-32.
- Yang** X, Cox-Foster DL. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proceedings of the National Academy of Science*. **2005**; 24; 102(21):7470-5.
- Yoshiyama** M, Kimura K. Distribution of *Nosema ceranae* in the European honeybee, *Apis mellifera* in Japan. *Journal of Invertebrate Pathology*. **2011**; 106(2):263–7.
- Yücel** B, Dogaroglu M: The impact of *Nosema apis* Z. infestation of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies after using different treatment methods and their effects on the population levels of workers and honey production on consecutive years. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. **2005**; 8:1142–1145.
- Yue** C, Genersch E. RT-PCR analysis of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology*. **2005**; 86:3419–3424.
- Zander** E. Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Leipziger Bienenztg* **1909**; 24: 147–150, 164–166.
- Zhang** Y y Talalay P. Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and mechanisms. *Cancer Research*. **1994**; 54, 1976s-1981s.
- Zheng** HQ, Gong HR, Huang SK, Sohr A, Hu FL, Chen YP. Evidence of the synergistic interaction of honey bee pathogens *Nosema ceranae* and deformed wing virus. *Veterinary Microbiology*. **2015**; 177(1-2):1-6.
- Zheng** HQ, Lin ZG, Huang SK, Sohr A, Wu L, y Chen YP. Spore loads may not be used alone as a direct indicator of the severity of *Nosema ceranae* infection in honey bees *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae). *Journal of Economic Entomology*, **2014**; 107(6), 2037–2044.
- Zhengyong** W, Fupin L, Jianrong L, Wenchu L, Yangsheng Z, Peichan T, Ziran H. Inactivation and mechanisms of chlorine dioxide on *Nosema bombycis*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2010; 104 (2): 134–139.
- Zhu** F, Shen Z, Hou J, Zhang J, Geng T, Tang X, Xu Ly Guo X. Identification of a protein interacting with the spore wall protein SWP26 of *Nosema bombycis* in a cultured BmN cell line of silkworm. *Infection, Genetics and Evolution*. **2013a**; 17, 38–45.
- Zhu** F, Shen Z, Xu L, Guo X. Molecular characteristics of the alpha- and beta-tubulin genes of *Nosema philosamiae*. *Folia Parasitology (Praha)*. **2013b**; 60(5):411-5.





# ANEXO I

CAPÍTULO I:  
Histogramas citometría de flujo

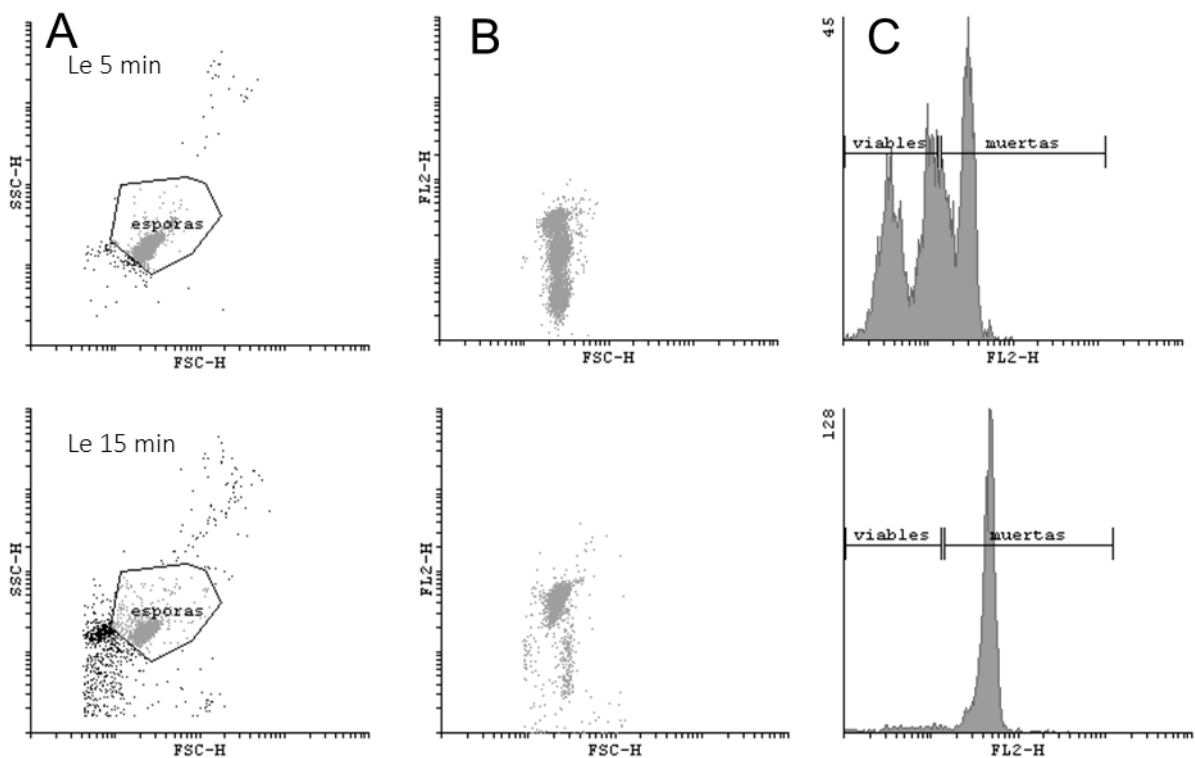


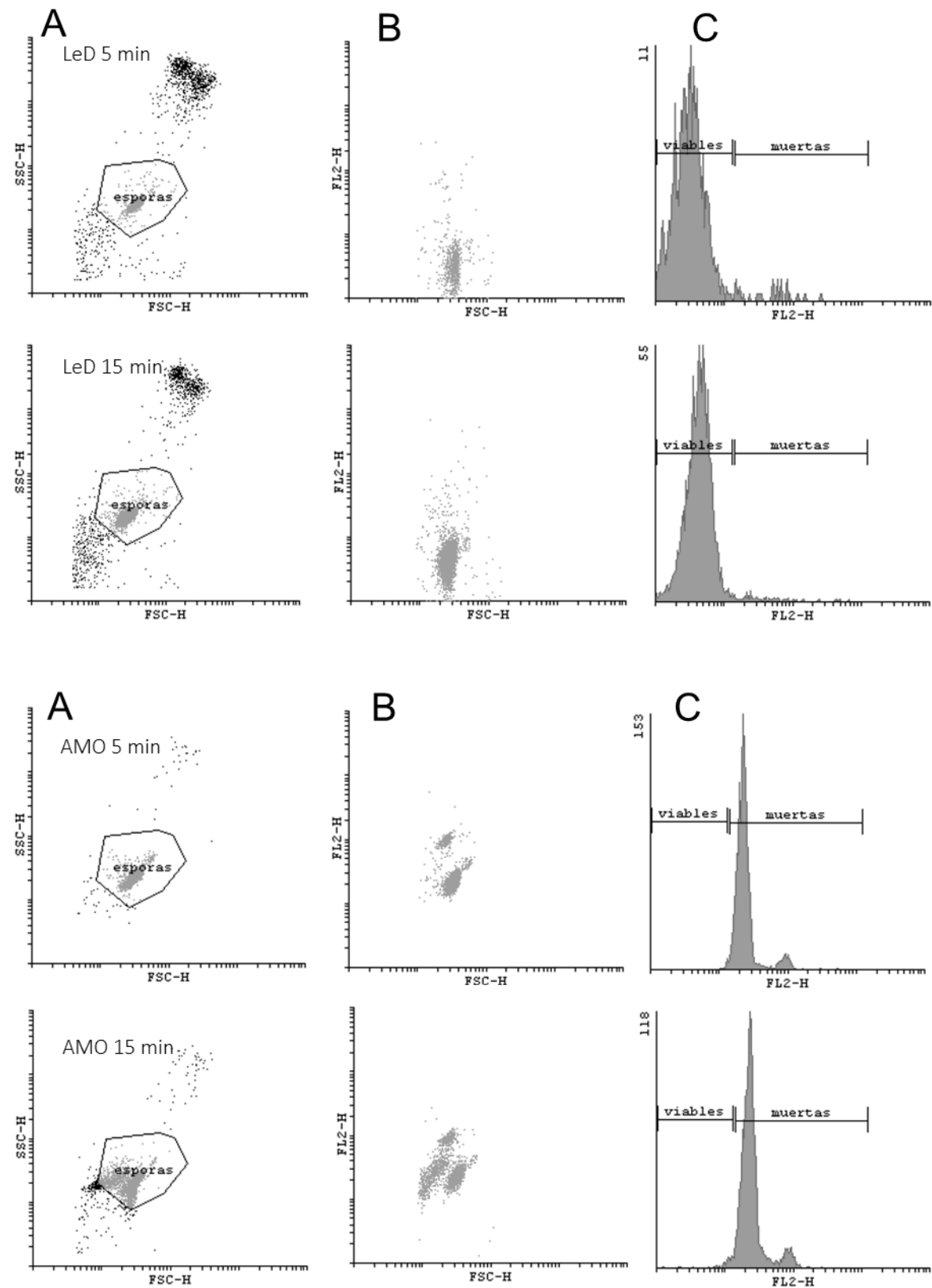
Anexo I: Representación de los histogramas obtenidos del análisis de citometría. Las características o parámetros de cada evento (esporas) están basados en la dispersión de la luz y de las propiedades de fluorescencia.

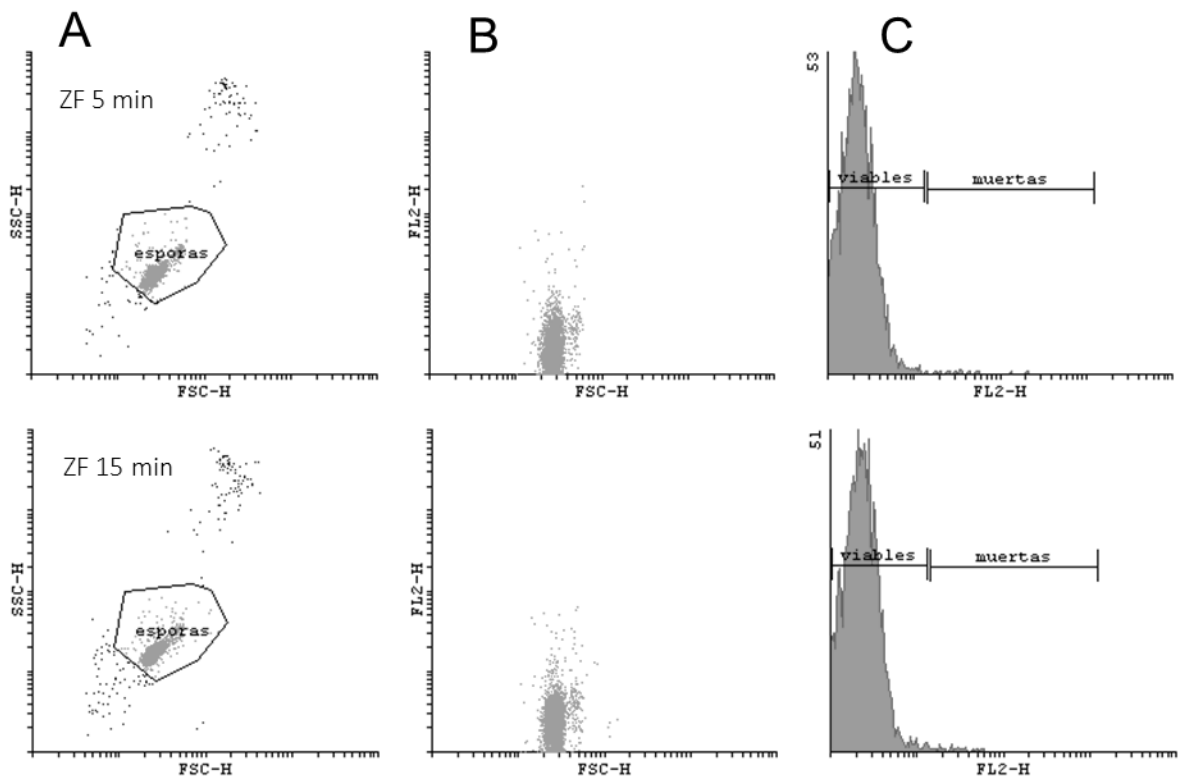
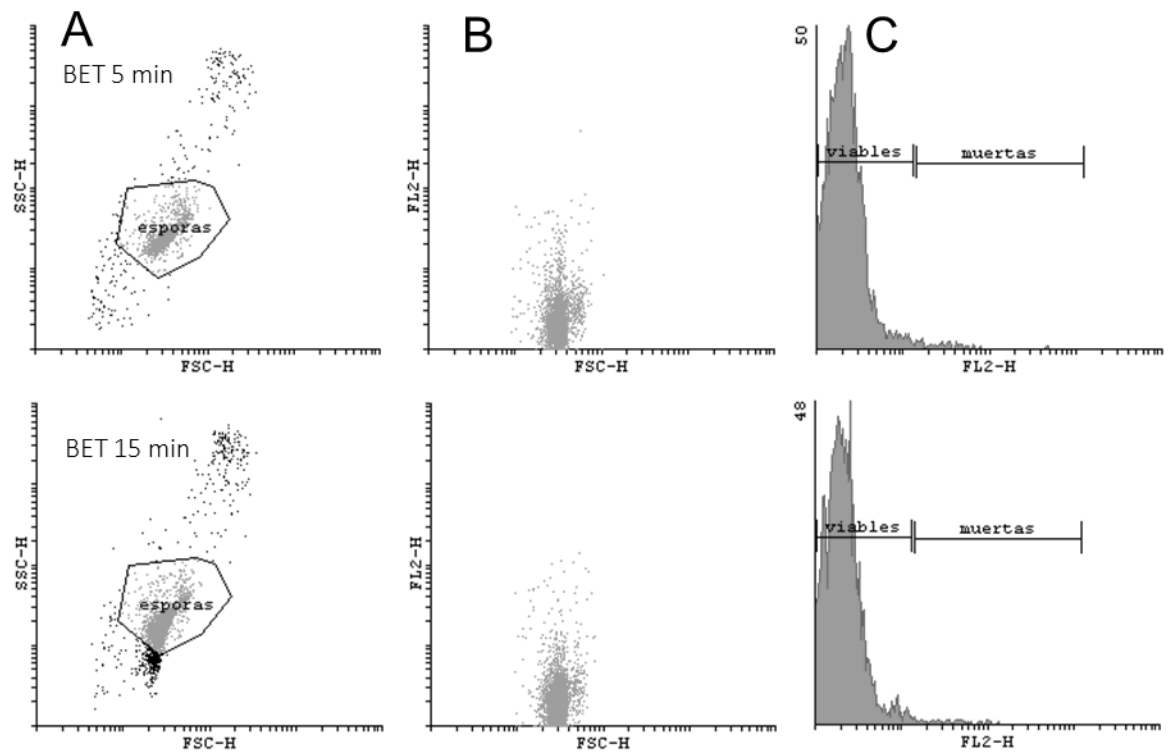
A, La dispersión frontal (FSC; *forward scatter*, determina el tamaño) y la dispersión lateral (SSC; *side scatter*, la complejidad) recogidos por los detectores de luz se conforman en escala logarítmica, identificando la población de esporas. Los polígonos representan la subpoblación de esporas, que se establece de acuerdo a estudios preliminares.

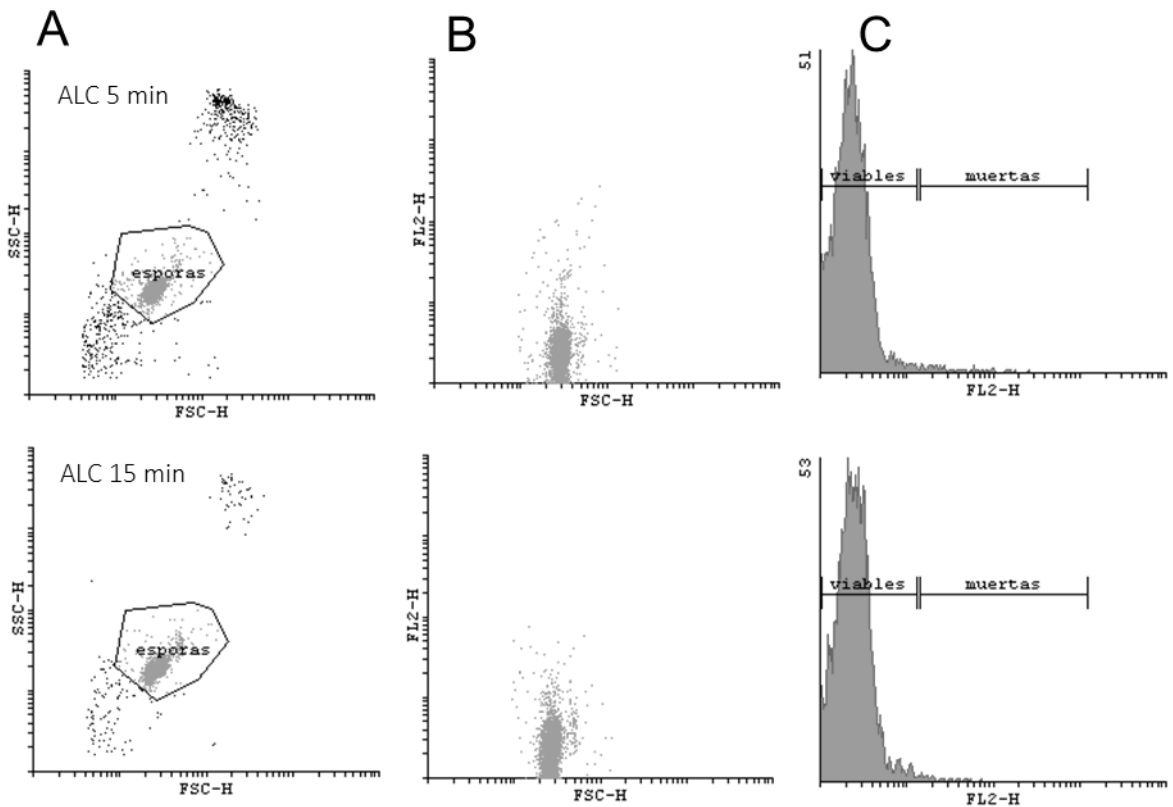
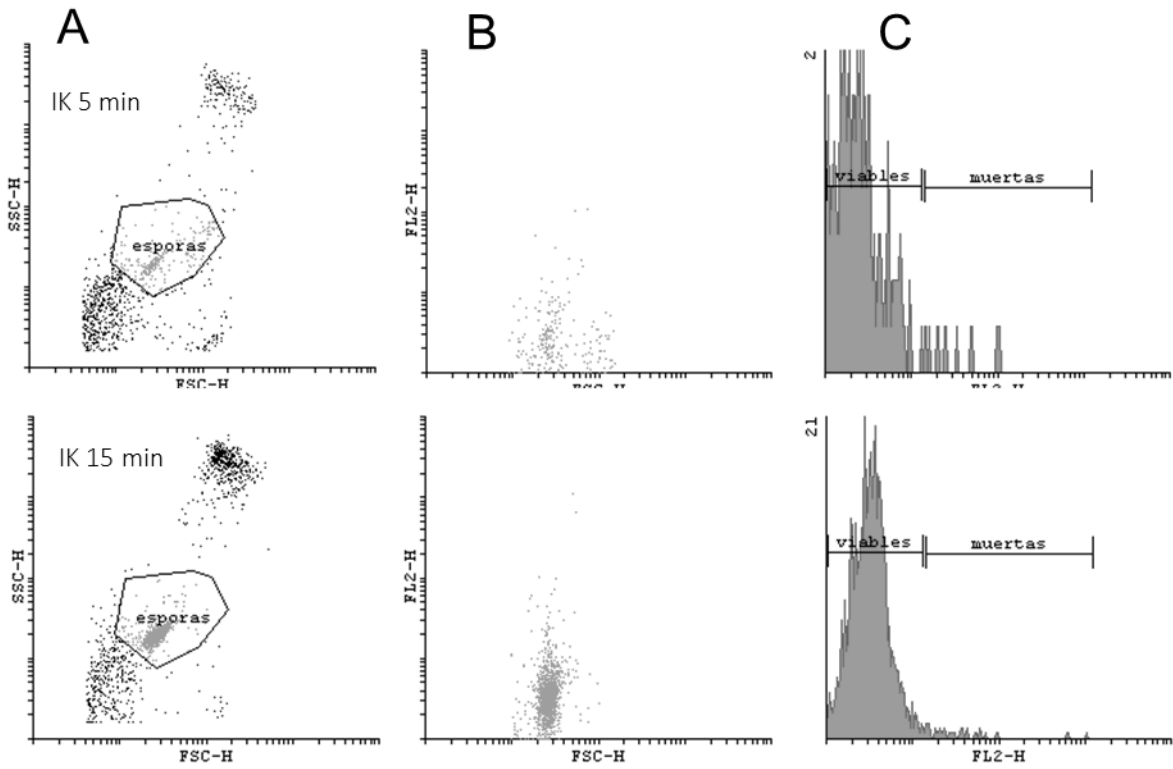
B, es la dispersión frontal de luz (FL2-H) detectada a 585/45 nm, que sirve para detectar la fluorescencia del PI (ioduro de propidio) bajo una emisión azul láser de argón a 480 nm.

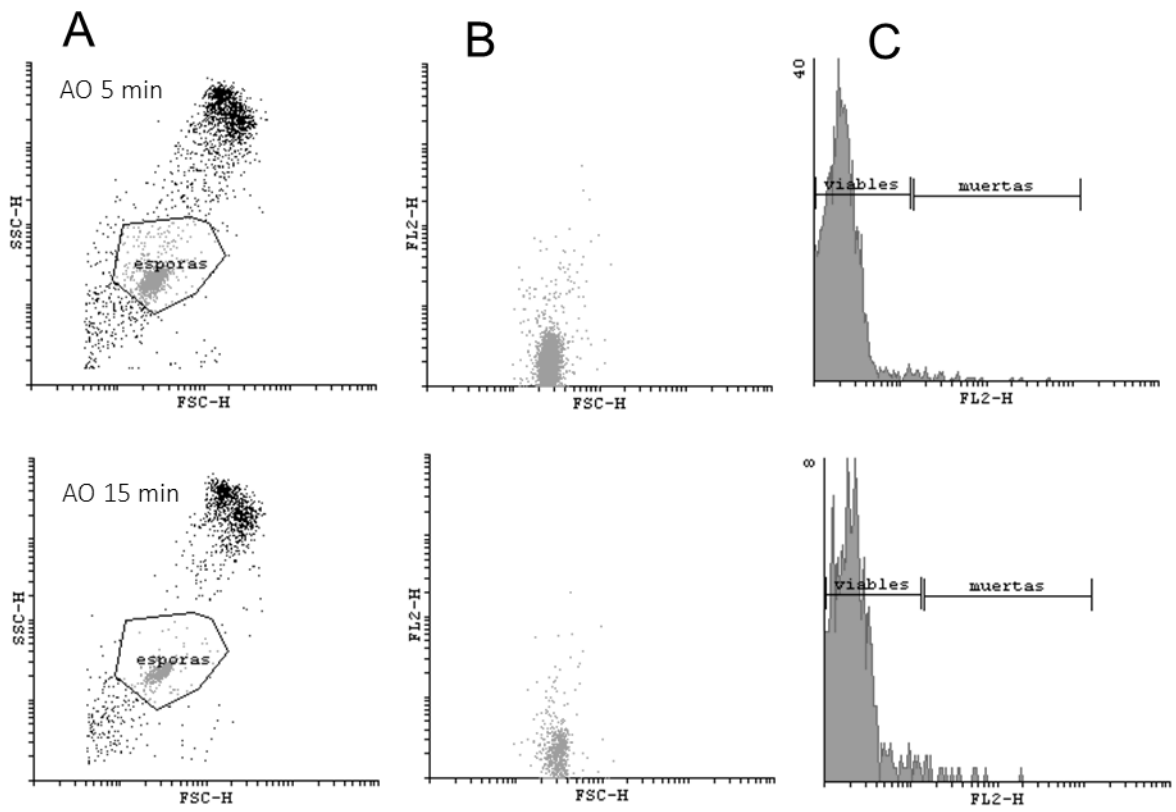
C, son los histogramas de las esporas representando la ausencia o presencia de fluorescencia de PI; en la ordenada se representa el recuento del número de esporas (eventos), mientras que en abscisas se indican la intensidad de la fluorescencia, todo ello en escala logarítmica.















# ANEXO II

Publicaciones científicas





**Preliminary effect of an experimental treatment with “Nozevit®”, (a phyto-pharmacological preparation) for *Nosema ceranae* control.**

Higes M, Gómez-Moracho T, Rodríguez-García C, Botias C, Martín-Hernández R.

Journal of Apicultural Research. 2014; 53(4): 472-474

Contribución en este trabajo:

Me incorporé en este ensayo a mi llegada al grupo de investigación, de manera que el diseño experimental y manejo me sirvió como entrenamiento para lo que después sería mi futuro ensayo de tratamientos de campo. Participé en el manejo de las colmenas y administración del tratamiento, así como análisis de patógenos en el laboratorio.



## NOTES AND COMMENTS



# Preliminary effect of an experimental treatment with “Nozevit<sup>®</sup>”, (a phyto-pharmacological preparation) for *Nosema ceranae* control

Mariano Higes<sup>1\*</sup>, Tamara Gómez-Moracho<sup>1</sup>, Cristina Rodríguez-García<sup>1</sup>, Cristina Botías<sup>1,3</sup>, Raquel Martín-Hernández<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centro Apícola, Laboratorio de Patología, Consejería de Agricultura, Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, 19180 Marchamalo, Guadalajara, Spain.

<sup>2</sup>Instituto de Recursos Humanos para la Ciencia y la Tecnología (INCRECYT), Fundación Parque Científico y Tecnológico de Albacete, Spain.

<sup>3</sup>Present address: School of Life Sciences, University of Sussex, Falmer, Brighton, BN1 9QG, UK.

Received 15 April 2013, accepted subject to revision 19 June 2013, accepted for publication 3 July 2013.

\*Corresponding author: Email: mhiges@jccm.es

**Keywords:** *Nosema ceranae*, treatment, Mediterranean country

The microsporidium *Nosema ceranae* was first detected in European honey bees less than a decade ago (Higes *et al.*, 2006), yet it is now one of the most prevalent worldwide pathogens of honey bees. Moreover, *N. ceranae* has been implicated in global colony loss and although its role in this phenomenon still remains controversial (Fries, 2010; Paxton, 2010; Higes *et al.*, 2013), a direct link between this pathogen and bee colony depopulation / losses has been suggested, in conjunction with subclinical effects and significantly reduced honey production in Mediterranean countries (Hatjina *et al.*, 2011; Botías *et al.*, 2013). As these effects can have a negative influence on professional beekeepers, it is important to develop strategies to control the disease associated with this pathogen. Fumagillin is one of the few drugs known to be effective against microsporidia and it is also effective in combating *N. ceranae* (Botías *et al.*, 2013), although its use is not currently authorized in most European countries.

In order to look for alternative treatments, in the present study we evaluated the effectiveness of “Nozevit<sup>®</sup>” a phyto-pharmacological preparation (Complete Bee, Anchorage, Alaska, USA) distributed in some countries such as Canada, Hungary, Romania and the USA etc. The possibility that Nozevit<sup>®</sup> might be a useful tool to control type C nosemosis was suggested by its capacity to control *Nosema apis* and *N. ceranae* (Tlak Gajger *et al.*, 2009).

In this study, 10 homogenous honey bee colonies naturally infected by *N. ceranae* were randomly assigned to two experimental groups in October 2012, each containing five colonies. All colonies were acquired as nuclei from the same professional beekeeper in March 2012, when they were introduced into the new hives. In June 2012, all colonies were naturally infected (PCR detection, Martín-Hernández *et al.*, 2012). At the start of the study, neither colony

showed clinical signs of chalkbrood, American or European foulbrood or varroa infestation.

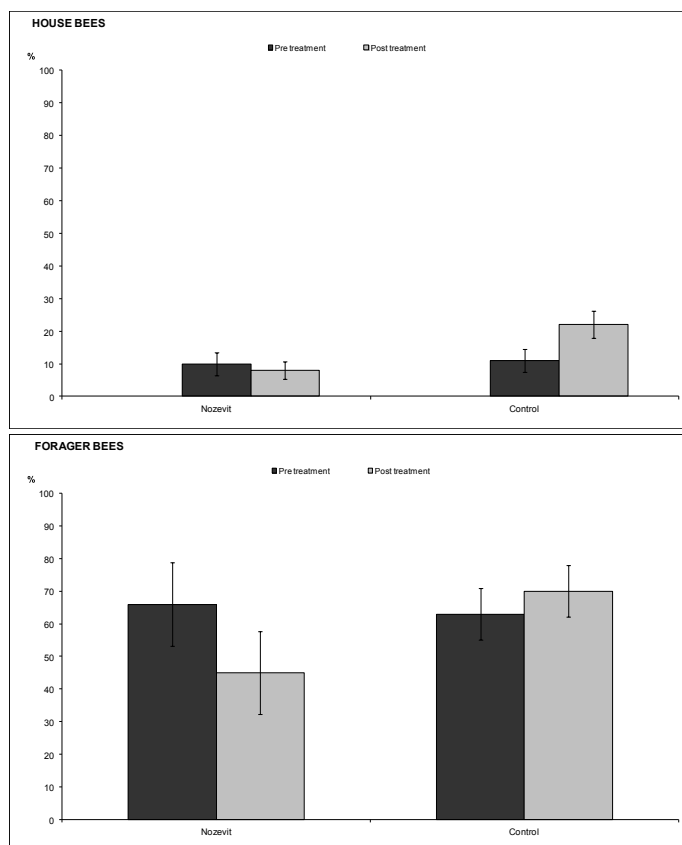
The colonies were distributed in two different apiaries in order to reduce the risk of re-infecting the treated colonies with *N. ceranae* through contact with the untreated ones (Botías *et al.*, 2013). Indeed, both apiaries were situated at a distance of 500 m from one another, and their environmental and geographical conditions were very similar being surrounded by the same type of flora (see Botías *et al.*, 2013).

In Apiary 1 (Nozevit colonies), the experimental groups were treated with Nozevit<sup>®</sup> (4 doses a week of 20 drops (1 ml) Nozevit<sup>®</sup> in 500ml of a sugar syrup vehicle, prepared as a 1:1 dilution of distilled water and sugar) in October 2012. This dosage is slightly different from that recommended by the manufacturer but it is more suited to our beekeeping conditions (see Higes *et al.*, 2011). In Apiary 2 (untreated control colonies), the colonies received 4 applications of 500 ml sugar syrup alone each week. Both sugar-syrup and Nozevit<sup>®</sup> were administered in plastic bags that were placed over the brood chamber, and their consumption was assessed weekly. Clinical signs indicative of pathologies other than Nosemosis, the presence of a queen and colony mortality were recorded at each visit to the apiaries.

As spore counts may not be the most accurate method to evaluate the load of *N. ceranae* infection in a colony (Meana *et al.*, 2010; Fries *et al.*, 2013; Goblirsch *et al.*, 2013), the percentage of worker bees infected by *Nosema* spp. was assessed in each colony before and after the treatment in autumn 2012 (see Botías *et al.*, 2013). In this way the effect of the different interventions on the evolution of *N. ceranae* infection could be determined. These bees were analysed individually by PCR to assess the species and the parasitic load.

Finally, the adult bee population was evaluated in October 2012 and March 2013 (Botías *et al.*, 2013).

The percentage of *N. ceranae* infected house and forager bees before the intervention was not significantly different between the groups (Mann-Whitney,  $p > 0.05$ ), which indicates that both groups had a comparable parasitic load at the beginning of the experiment (Fig. 1, Apiary 1, Nozevit, house bee: 10 % infected; forager bee: 66 % infected. Apiary 2, Control, house bee: 11 % infected; forager bee: 63% infected). In the treated group (Apiary 1, Nozevit), the percentage of infected house bees after treatment appeared to decrease slightly although the differences were not significant compared to pre-treatment values (Mann-Whitney,  $p > 0.05$ ). By contrast, there was a significant decrease in the proportion of infected foragers in this apiary (Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ) after treatment application compared to pre-treatment values. Conversely, the rates of infection tended to increase in the untreated colonies (Apiary 2, Control) and indeed, the percentage of parasitized house bees doubled (Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ) and the number of infected forager bees also appeared to increase, although this effect was not statistically significant (Mann-Whitney,  $p > 0.05$ ). Moreover, in March 2013 the treated colonies had a significantly larger adult bee population ( $7.2 \pm 1.8$  bee combs, mean  $\pm$  s.d.) than the untreated colonies ( $3.8 \pm 1.3$  bee combs, mean  $\pm$  s.d.: Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ). Indeed, all the colonies in the treated group were alive at this time, whereas only 60 % of the control colonies had survived.



**Fig. 1.** Percentage of individual infected bees before (black) and after (grey) interventions in each experimental group. Apiary 1: colonies treated with Nozevit®. Apiary 2: untreated colonies.

The negative influence of *N. ceranae* infection on adult honey bee population size has been confirmed recently in several studies carried out under field conditions (Dussaubat *et al.*, 2013; Goblirsch *et al.*, 2013; Villa *et al.*, 2013), which has also been seen to be associated with the loss of flexibility in the response to colony demands, physiological changes, modified flight behaviour and less brood area. Hence, when this microsporidium is not controlled infection will certainly lead to a significant decrease in honey production and probably to colony loss.

Spain has the largest number of honey bee colonies in the European Union, leading to the highest honey production, and it has the second largest population of professional beekeepers after Greece. For this reason, it is clear that any colony loss or reduced honey yield represents an important concern for professional beekeepers. Similar figures are likely to be observed in the most productive European countries, mainly those concentrated in the Mediterranean area, a region that presents environmental conditions favourable for the multiplication of the microsporidium (Martín-Hernández *et al.*, 2012).

The treatment used here to control *Nosema* infection reduced the load of this pathogen in the colonies, as previously proposed for *N. apis* and *N. ceranae* (Tlak Gajger *et al.*, 2009). However the dosage applied in our study is different to that used by these researchers. While the efficacy of this product under our experimental conditions was lower than that observed for fumagillin (Botías *et al.*, 2013), our results suggest that, in the absence of the availability of other products to beekeepers, Nozevit® could be used in an integrated programme to control nosemosis type C. If the number of bees parasitized can be reduced, the negative effects of this pathogen on the colony will be dampened and there will be less risk of collapse (Botías *et al.*, 2013; Goblirsch *et al.*, 2013).

## Acknowledgements

The authors wish to thank J Almagro, J García, A Cepero, C Uceta, V Albendea, C Rogerio, T Corrales, M Gajero for their technical support (staff of honey bee pathology laboratory). Financial support was provided by Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (Consejería de Agricultura) and INIA-FEDER funds (RTA2009- 000105-C02-01, RTA2009-00057, RTA2012-00076-C02-01).

## Conflict of interest statement

None of the authors have any financial or personal relationships that could inappropriately influence or bias the content of the paper. Trademarks are mentioned for scientific purposes only and this work does not explicitly recommend any of these products.

## References

- BOTÍAS, C; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R; BARRIOS, L; MEANA, A; HIGES, M (2013) *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Veterinary Research*, 44: 25. <http://dx.doi.org/10.1186/1297-9716-44-25>
- DUSSAUBAT, C; MAISONNASSE, A; CRAUSER, D; BESLAY, D; COSTAGLIOLA, G; SOUBEYRAND, S; KRETZCHMAR, A; LE CONTE, Y (2013) Flight behaviour and pheromone changes associated to *Nosema ceranae* infection of honey bee workers (*Apis mellifera*) in field conditions. *Journal of Invertebrate Pathology*, 113(1): 42-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2013.01.002>
- FRIES, I (2010) *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 103 Suppl 1: S73-79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.017>
- FRIES, I; CHAUZAT, M-P; CHEN, Y-P; DOUBLET, V; GENERSCH, E; GISDER, S; HIGES, M; MCMAHON, D P; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R; NATSOPOULOU, M; PAXTON, R J; TANNER, G; WEBSTER, T C; WILLIAMS, G R (2013) Standard methods for nosema research. In V Dietemann; J D Ellis, P Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK: Volume II: Standard methods for Apis mellifera pest and pathogen research*. *Journal of Apicultural Research* 52(1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.14>
- GLOBLIRSCH, M; HUANG, Z; SPIVAK, M (2013) Physiological and behavioural changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. *PLoS One*, 8(3): e58165. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0058165>
- HATJINA, F; TSOKTOURIDIS, G; BOUGA, M; CHARISTOS, L; EVANGELOU, V; AVTZIS, D; MEEUS, I; BRUNAIN, M; SMAGGHE, G; DE GRAAF, D C (2011) Polar tube protein gene diversity among *Nosema ceranae* strains derived from a Greek honey bee health study. *Journal of Invertebrate Pathology*, 108(2): 131-134. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2011.07.003>
- HIGES, M; MARTÍN, R; MEANA, A (2006) *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honey bees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92(2): 93-95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2006.02.005>
- HIGES, M; MARTÍN, R; MEANA, A (2010). *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie*, 41(3): 375-392. <http://dx.doi.org/10.1051/apido/2010019>
- HIGES, M; MEANA, A; BARTOLOMÉ, C; BOTÍAS, C; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R (2013) *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1): 17-29. <http://dx.doi.org/10.1111/1758-2229.12024>
- MARTÍN-HERNÁNDEZ, R; BOTÍAS, C; GARRIDO-BAILÓN, E; MARTÍNEZ-SALVADOR, A; PRIETO, L; MEANA, A; HIGES, M (2012) Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environmental Microbiology*, 14: 2127-2138. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02645.x>
- MEANA, A; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R; HIGES, M (2010) The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 49(2): 212-214. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.49.2.12>
- PAXTON, R J (2010) Does infection by *Nosema ceranae* cause "Colony Collapse Disorder" in honey bees (*Apis mellifera*)? *Journal of Apicultural Research*, 49(1): 80-84. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.11>
- TLAK GAJGER, I; PETRINEC, Z; PINTER LJ; KOZARIC, Z (2009) Experimental treatment of nosema disease with "Nozevit" phytopharmacological preparation. *American Bee Journal*, 149: 485-4
- VILLA, J D; BOURGEOIS, A L; DANKA, R G (2013) Negative evidence for effects of genetic origin of bees on *Nosema ceranae*, positive evidence for effects of *Nosema ceranae* on bees. *Apidologie*, 44 (5): 511-518. <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-013-0201-1>





## Effect of oxalic acid on *Nosema ceranae* infection.

Nanetti A, Rodríguez-García C, Meana A, Martín-Hernández R, Higes M.

Research Veterinary Science. 2015; 102: 167-172

### Contribución en este trabajo:

Durante los primeros meses en el Centro Apícola Regional de Marchamalo, colaboré en los trabajos de campo llevados a cabo para este ensayo que, al igual que en el ensayo de Nozevit®, me sirvieron como entrenamiento para la puesta a punto de mi futuro ensayo en campo. Además aprendí durante este trabajo el manejo de las abejas en laboratorio así como el procedimiento de puesta a punto en el mismo de las infecciones experimentales.





Contents lists available at ScienceDirect

## Research in Veterinary Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yrvsc](http://www.elsevier.com/locate/yrvsc)Effect of oxalic acid on *Nosema ceranae* infection

Antonio Nanetti <sup>a,\*,1</sup>, Cristina Rodríguez-García <sup>b,1</sup>, Aránzazu Meana <sup>c,1</sup>,  
Raquel Martín-Hernández <sup>b,d,1</sup>, Mariano Higes <sup>b,1</sup>

<sup>a</sup> Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria, Unità di Ricerca di Apicoltura e Bachicoltura, CREA-API, Via di Saliceto 80, 40128 Bologna, Italy

<sup>b</sup> Laboratorio de Patología Apícola, Centro Apícola Regional, Consejería de Agricultura, JCCM, 19180 Marchamalo, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>d</sup> Instituto de Recursos Humanos para la Ciencia y la Tecnología (INCRECYT), Fundación Parque Científico y Tecnológico de Albacete, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 8 April 2015

Received in revised form 13 July 2015

Accepted 2 August 2015

Available online xxxx

## Keywords:

*Apis mellifera**Nosema ceranae*

Oxalic acid

Control

Prevalence

Organic apiculture

## ABSTRACT

*Nosema ceranae* is a honey bee pathogen parasitizing the ventricular epithelium and potentially causing colony death. The effect of 0.25 M oxalic acid solution administered to the bees in the form of sugar syrup was determined in laboratory and field trials. The spore numbers in an 8-day laboratory experiment were significantly lower when AO was administered (treated:  $11.86 \pm 0.94$  s.e.  $\times 10^6$ ; untreated:  $30.64 \pm 0.31$  s.e.  $\times 10^6$ ). When administered in autumn to free flying colonies twice, 3 weeks apart, the infection prevalence decreased in young (relative reduction of  $53.8\% \pm 6.5$  s.e.) and old bees (relative reduction of  $44.4\% \pm 6.0$  s.e.). Meanwhile increased prevalence in all the controls was detected (young and old bees: relative increase of  $45.7\% \pm 22.8$  s.e. and  $10.2\% \pm 5.9$  s.e., respectively). While all the treated colonies overwintered correctly, the untreated ones did not (3 out of 5 were dead).

In the absence of commercial products approved in several countries to control nosema, oxalic acid syrup appears promising in the development of alternative management strategies.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Oxalic acid (OA) is one of the strongest organic acids. It is a natural constituent of living organisms and foodstuff, honey included, as free acid and oxalates. Toxicity of oxalic acid against *Varroa destructor* was shown in controlled laboratory experiments (Milani, 2001) and it has been used for years for control in the field in the form of sugar water syrups (Nanetti et al., 2003b). The treatments can be applied by trickling 0.3–0.5 M solutions (pH about 0.9–1) added with sucrose into the colonies (Nanetti and Stradi, 1997), where the substance is deemed to act as a contact agent. The bees do not show a tendency to feed on the liquid [unpublished observations], but pharmacokinetic studies revealed prompt absorption by the bees and distribution amongst the adult individuals of the colony after administration (Nanetti et al., 2003a). In spite of ingestion, therapeutic doses of OA are tolerated by the bees and are not associated with patent negative effects. In fact, although immunohistochemical

analysis showed necrotic cell death in ventriculi of bees fed with oxalic acid (Gregorc and Škerl, 2007) and other studies put into evidence decreased bee longevity (Schneider et al., 2012), in an extensive investigation performed in several European countries obvious negative effects on the adult population of the colonies were not observed (Nanetti et al., 2003b).

In recent years, *Nosema ceranae* has become one of the most prevalent honey bee pathogens worldwide (Fries, 2010; Higes et al., 2010, 2013). In some regions (especially warm areas) it is reportedly implicated in the general phenomenon of honey bee colony losses (Bacandritsos et al., 2010; Bekele et al., 2015; Bromenshenk et al., 2010; Hatjina et al., 2011; Higes et al., 2008; Natsopoulou et al., 2015; Soroker et al., 2011; Suwannapong et al., 2011), but in colder areas its responsibility in events of widespread mortality has been ruled out (Gisder et al., 2010; Hedtker et al., 2011; Stevanovic et al., 2011). In spite of these discrepancies, it is generally accepted that better colony development can be expected following treatments against nosema (Botías et al., 2013; Higes et al., 2010, 2013). Finally, recovery was also observed by Van der Zee in *N. ceranae* infected colonies after OA treatments against *Varroa* infestations (personal communication).

With this study we wanted to create the basis to develop new control methods for *N. ceranae* treatment. For this purpose, we tested the efficacy of OA solution against artificial and natural infections.

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [antonio.nanetti@entecra.it](mailto:antonio.nanetti@entecra.it) (A. Nanetti), [crodriguezgarcia@externas.jccm.es](mailto:crodriguezgarcia@externas.jccm.es) (C. Rodríguez-García), [ameana@ucm.es](mailto:ameana@ucm.es) (A. Meana), [rmhernandez@jccm.es](mailto:rmhernandez@jccm.es) (R. Martín-Hernández), [mhiges@jccm.es](mailto:mhiges@jccm.es) (M. Higes).

<sup>1</sup> The authors contributed equally to this work.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Laboratory procedure

#### 2.1.1. Preparation of *N. ceranae* spores

To obtain fresh *N. ceranae* spores, three infected colonies of *Apis mellifera iberiensis* located at the Regional Apicultural Center (CAR), Central Spain, were used. One hundred flying bees were collected from each colony and processed separately according to Botías et al. (2012) and Martín-Hernández et al. (2012). In short, the abdomens of each sample were pooled and macerated with a Stomacher 80 Biomaster (Seward, West Sussex, UK) provided with strainer bags (BA6040/STR, Seward) first in 25 ml and, after recovery, in 10 ml of PCRq water. A centrifugation (6 min at 800 rpm) allowed us to obtain a pellet, that was suspended into 1 ml of PCRq water and stored at room temperature until use.

The species assessment of the spores was made by PCR according to Martín-Hernández et al. (2012). Concisely, aliquots of the macerates were shaken at 9500 rpm for 95 s with ceramic beads (MagNA Lyser Green Beads, Roche 03 358 941 001). The DNA was extracted with MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche 03 730 964 001) in a MagNA pure compact machine (Roche). The PCR amplification was performed with 218MITOC FOR/218MITOC REV and 321APIS FOR/321APIS REV primers, specific for *N. ceranae* and for *N. apis* respectively and COI as an internal control. The PCR products were analysed in a QIAxcel System (Qiagen, Hilden, Germany) using a QIAxcel DNA High Resolution Kit (Qiagen, No. 929002) to detect positive and negative reactions. Negative controls were included to detect and exclude possible contaminations.

Once the presence of *N. ceranae* spores and the absence of *N. apis* spores were ascertained, the suspensions were mixed, purified by Percoll density gradient centrifugation (Higes et al., 2008; Martín-Hernández et al., 2011) and maintained at room temperature for 5 days or less. Finally, counts in Neubauer haemocytometer chamber under phase contrast microscope allowed us to calculate the spore concentration in the purified suspension (Higes et al., 2007).

#### 2.1.2. Experimental infections

Brood combs were taken from three *A. m. iberiensis* colonies found free of *N. ceranae* and *N. apis* infections by PCR (Higes et al., 2007) and maintained in an incubator at  $34 \pm 1$  °C. On hatching, new adult bees were carefully transferred into nine cylindrical mesh cages (base: 71 mm<sup>2</sup>; length: 175 mm) and stored at  $33 \pm 1$  °C for five days. Syrup was provided *ad libitum* (50% sugar water with 2% Promotor L, Calier Lab as pollen substitute) by plastic feeder.

One hundred and twenty bees, five days old, were starved for 2 h. After slight anaesthetisation with CO<sub>2</sub> to make handling easier, they were artificially fed 2 µl each of 50% sugar water containing 150,000 *N. ceranae* spores. As needed, the mouth parts were stimulated to induce the ingestion of the droplet from the micropipette. Individuals not consuming the entire dose were discarded (Higes et al., 2007, 2010). The same procedure was used to administer sugar water not containing spores to 60 other honey bees.

Three groups of 60 adults each were formed from the infected and uninfected bees above. Groups I and II were composed of infected bees and group III of uninfected controls. The individuals of each group were split into three subunits of 20 and transferred into 9 mesh

cages. To avoid cross contaminations, the 6 cages containing infected bees and the 3 containing the uninfected ones were stored separately at  $33 \pm 1$  °C into two Memmert incubators of same age and model (Mod. IPP500).

Each cage of groups II and III was provided with 2 ml syrup (50% sugar water with 2% Promotor L, Calier Lab) for eight days, via feeder. The cages of group I received by the same method 0.25 M oxalic acid syrup, the last being composed as described above. Ecoxal® (Ceva) was used as source of oxalic acid.

On days 4, 6 and 8 post-infection (p.i.), five bees were removed randomly from each cage, pooled in samples of 15 individuals and dissected. To assess their degree of infection, the abdomens were introduced into sterile Eppendorf microtubes filled with 200 µl of PCRq water. After thorough grinding, the spores were counted using a haemocytometer and a phase contrast microscope. PCR was then used to confirm that the spores belonged to *N. ceranae* species.

### 2.2. Field trial

In May, ten colonies of the apiary at CAR were equalised to 10 combs covered with bees and 5 with brood. At that time and until the end of the experiment none of them showed symptoms of American foulbrood, European foulbrood and chalkbrood. Symptomatic *Nosema* spp. infections and *V. destructor* infestations were not present.

Samples of flying bees were collected from each colony and analysed by PCR (Martín-Hernández et al., 2012) to confirm that they were infected by *N. ceranae*. Two groups of 5 colonies each were then formed by simple randomisation without replacement.

On 26 October the colonies of one of the groups were treated with 50 ml of 0.25 M oxalic acid syrup (50% sugar water with 2% Promotor L, Calier Lab) that was dispensed by trickling onto the combs with a syringe. The same day, the colonies of the other group received syrup without oxalic acid. On 16 November the administration was repeated according to the method described above.

Samples of 20 bees were collected on 25 October (pre-treatment) and on 23 November (post-treatment) from the entrance and from the brood chamber of each colony (assumed to represent the young and the old colony population, respectively). They were analysed individually to quantify the infection prevalence according to Higes et al. (2008) and Botías et al. (2013). In short, 20 abdomens of each sample were dissected and introduced in 96-well plates (Qiagen) containing glass beads (2 mm diameter; Sigma) and 300 µl of PCRq water. Once shaken in TissueLyser® (Qiagen) for 6 min at 30 Hz, the DNA was extracted and analysed by PCR as described previously (Martín-Hernández et al., 2012).

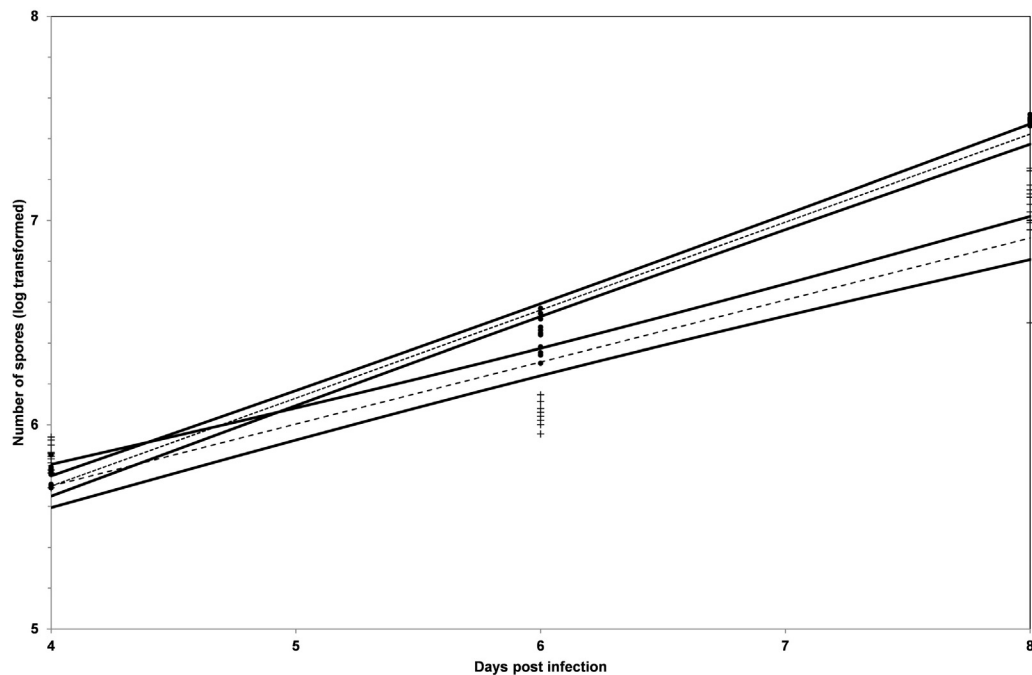
Three months after the second administration, the colonies were inspected to evaluate their general conditions and the number of combs covered with the bees and the ones containing brood.

### 2.3. Statistical analysis

The package Statistica 7.0 was utilised for the statistical analysis of data. Non parametric approach (Mann–Whitney *U* test and Wilcoxon test for paired samples) was used, except for the calculation of regression parameters and for the comparison of regression lines (analysis of covariance).

**Table 1**  
Count of *Nosema ceranae* spores in the artificially infected groups at the three sampling points (in millions).

| d p.i. | Group I (treated infected) |              |      |              | Group II (untreated infected) |              |      |               | Mann–Whitney U-test |       |
|--------|----------------------------|--------------|------|--------------|-------------------------------|--------------|------|---------------|---------------------|-------|
|        | N                          | Mean ± s.e   | s.d. | C.I. (95%)   | N                             | Mean ± s.e   | s.d. | C.I. (95%)    | U                   | p     |
| 4      | 15                         | 0.69 ± 0.03  | 0.10 | 0.63 ± 0.74  | 15                            | 0.58 ± 0.01  | 0.05 | 0.55 ± 0.61   | 39.0                | 0.002 |
| 6      | 15                         | 1.11 ± 0.04  | 0.16 | 1.02 ± 1.20  | 15                            | 2.77 ± 0.13  | 0.50 | 2.49 ± 3.05   | 0.0                 | 0.000 |
| 8      | 15                         | 11.86 ± 0.94 | 3.66 | 9.84 ± 13.89 | 15                            | 30.64 ± 0.31 | 1.18 | 29.99 ± 31.30 | 0.0                 | 0.000 |



**Fig. 1.** Simple linear regression of the transformed spore counts measured in the artificially infected groups during the sampling period: regression lines (dotted: untreated; dashed: treated), individual data (dots: untreated; crosses: treated) and their 95% confidence intervals.

The relative change of prevalence ( $100 \times [\text{PRE} - \text{POST}] / \text{PRE}$ ) in the three-week treatment interval was calculated for external and internal samples, and used as an indicator of the treatment efficacy in the field trial.

Small sample size suggested the use of Fisher's exact test instead of squared Chi to compare frequencies.

### 3. Results

#### 3.1. Laboratory trial with artificial infections

*N. ceranae* infections were detected in all samples, except in the ones belonging to Group III. This confirms the lack of detectable infections in the colonies providing the samples and the reliability of the laboratory procedures. The average number of spores was respectively higher in group I at 4 d p.i. and in Group II at 6 and 8 d p.i. (Table 1).

In both groups, the spore number increased by one and two orders of magnitude respectively in the first two sampling days (4–6 d p.i.) and in the overall four-day sampling period (4–8 d p.i.). The exponential-like trend suggested the transformation of the original infection data into logarithms, to allow for the adoption of a linear model approach in the statistical analysis. The analysis of variance for the regression lines separately drawn in Fig. 1 shows fit to the transformed data of Group I ( $F(1, 43) = 222.9$ ,  $p = 0.000$ ; adjusted squared  $R = 0.835$ ) and Group II ( $F(1, 43) = 2045.5$ ,  $p = 0.000$ ; adjusted squared  $R = 0.979$ ). Analysis of covariance was conducted to compare the two regression lines (Snedecor

and Cochran, 1967), showing results that were significantly different in slope and elevation (Table 2). This indicates more rapid prevalence increase in non-treated control cages in comparison to the treated ones, as shown also by the functions corresponding to the untransformed data:

- Group I: spore number =  $30,576 \times e^{(0.699 \times \text{d p.i.})}$ ,
- Group II: spore number =  $9474 \times e^{(0.992 \times \text{d p.i.})}$ .

#### 3.2. Field trial with natural infections

Fig. 2 shows the average prevalence after PCR analysis in each group of colonies ( $n = 5$ ). A Mann–Whitney test was used to test whether the infection was homogeneous at the pre-treatment check of the two groups. Overall, the prevalence in samples collected at the hive entrance (old bees) was  $85.5\% \pm 2.23$  s.e. ( $U(5, 5) = 8.0$ ,  $Z = 0.940$ ,  $p = 0.337$ ) and  $29.5 \pm 5.60$  s.e. in the young bees from the brood nest ( $U(5, 5) = 12.0$ ,  $Z = -0.104$ ,  $p = 0.917$ ). The lack of evident between-group differences of pre-treatment prevalence validates the correct randomisation of the experiment. A Wilcoxon test for paired samples showed higher prevalence in external pre-treatment samples in comparison to the internal ones ( $T(10) = 0.000$ ,  $Z = 2.803$ ,  $p = 0.005$ ).

In the untreated colonies, a Wilcoxon test evidenced a prevalence difference between pre and post treatment samples both in internal ( $T(5) = 0.000$ ,  $Z = 1.604$ ,  $p = 0.109$ ) and in external bees, ( $T(5) =$

**Table 2**

Test for slope and elevation homogeneity. The regression lines of log transformed spore counts of the laboratory experiment are compared (analysis of covariance from Statistica 7, elaboration according to Snedecor and Cochran, 1967).

|                      | Slopes $\pm$ s.e. | C.I. (95%)        | d.f. | S.S.  | M.S.  | F     | p     |
|----------------------|-------------------|-------------------|------|-------|-------|-------|-------|
| Within control group | $0.431 \pm 0.010$ | $0.412 \pm 0.450$ | 43   | 0.468 | 0.011 |       |       |
| Within treated group | $0.304 \pm 0.020$ | $0.263 \pm 0.345$ | 43   | 2.135 | 0.050 |       |       |
| Regression residual  |                   |                   | 86   | 2.603 | 0.030 |       |       |
| Pooled slope         | $0.367 \pm 0.015$ | $0.337 \pm 0.398$ | 88   | 3.573 | 0.041 |       |       |
| Line parallelism     |                   |                   | 1    | 0.970 | 0.970 | 32.02 | 0.000 |
| Common regression    |                   |                   | 88   | 5.027 | 0.057 |       |       |
| Line elevation       |                   |                   | 1    | 1.453 | 1.453 | 35.34 | 0.000 |

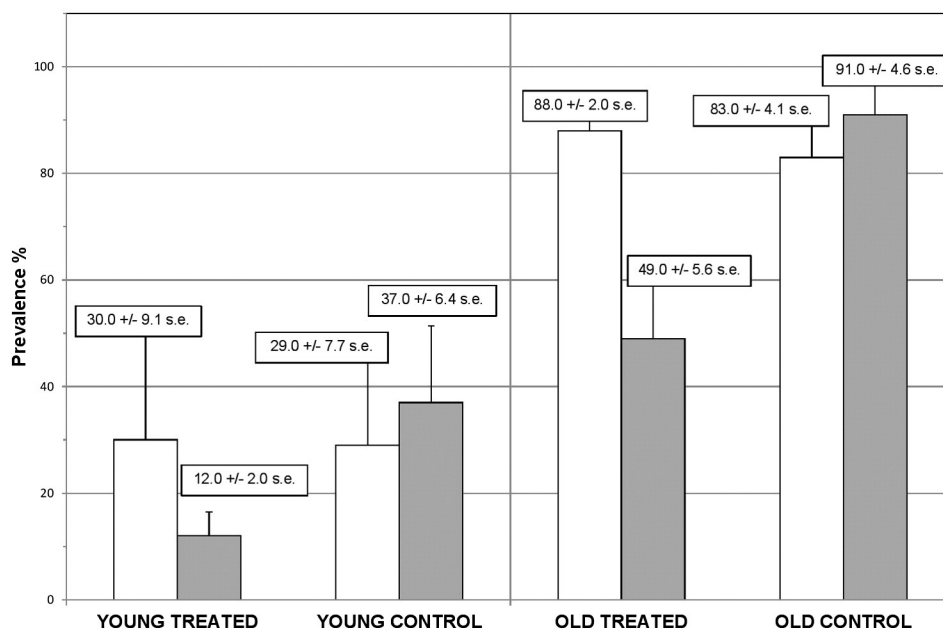


Fig. 2. Prevalence of infected bees in the honey bee samples: average (white: pre-treatment; grey: post-treatment) and standard deviation (pins).

0.000,  $Z = 1.826$ ,  $p = 0.068$ ). However, it should be noted that the observed increases are supported by probability coefficients slightly higher than the conventional threshold  $\alpha = 0.05$ .

Conversely, in the treated group the prevalence of infected bees decreased both in samples from the hive entrance ( $T(5) = 0.000$ ,  $Z = 2.023$ ,  $p = 0.043$ ) and in the ones from the brood nest ( $T(5) = 0.000$ ,  $Z = 2.023$ ,  $p = 0.043$ ).

The relative change of prevalence in the three weeks of treatment was compared with a Mann–Whitney test (Fig. 3). This was negative in all samples from the treated colonies and positive or null in the controls, both in old ( $U(5, 5) = 0.0$ ,  $Z = -2.61$ ,  $p = 0.009$ ) and young bee samples ( $U(5, 5) = 0.0$ ,  $Z = -2.61$ ,  $p = 0.008$ ).

The colony checks made in February following the treatment aimed at evidencing whether the treatments improved the health condition in comparison to the control administrations. As shown in Fig. 4, whereas the control group lost three out of five colonies, all the treated ones survived the winter, (one-tailed Fisher's exact test:  $p = 0.083$ ). However, the bad conditions of the surviving colonies made further recovery unlikely in the next spring.

#### 4. Discussion

As reported, therapeutic OA solutions are hardly ingested by the honey bees. Although this is likely to play little influence on the effect against the *Varroa* mite, it should be noted that *N. ceranae* is a ventricular parasite that must be reached once established in its target organ. Palatability is then important if the honey bee ventriculum has to be reached, and this is why this study was conducted by using relatively low concentrations, that preliminary observations proved acceptable for the bees.

Based on polyethism, bees taken from the hive entrance were considered as representative for the older population of the colony, while bees from the brood nest represented the young population.

In agreement with Higes et al., 2008 the infection prevalence of untreated colonies was 2.9 times higher in old than in young bees as a consequence of higher chances of contact with infected substrates and of protracted infection growth. This stresses the need to sample old bees to spot subacute infections, and individuals of both ages for quantitative studies (Chen et al., 2012; Meana et al., 2010).

In November, the prevalence of infected young bees sampled from the untreated controls averaged 37%. All of them failed to overwinter correctly (Fig. 5). The reported value is very close to the limit mentioned by Higes et al., 2008, who observed detrimental effects on colonies when the samples of young bees contained 40% of infected individuals or more. Similar conclusions were substantiated by other authors reporting decreased lifespan in *N. ceranae* infected bees (Dussaubat et al., 2013; Goblirsch et al., 2013).

In the pre–post-treatment period, the proportion of infected bees increased both in old (10.2%) and in young bees (45.7%) of untreated colonies, but decreased in the treated group (44.4% and 53.8% respectively). All the colonies receiving oxalic acid survived the winter in fair and uniform condition as a likely consequence of the treatment efficacy.

In the laboratory oxalic acid ingestion hindered the development of *N. ceranae* infections compared to untreated controls, confirming the results obtained in the field. Nonetheless it must be considered that 0.25 M concentration was selected based on practical reasons rather than on the infection inhibition. Actually, full control could not be attained and this makes it advisable to investigate further to optimise concentration and use in the field. Coformulants different from sucrose should be tested as well.

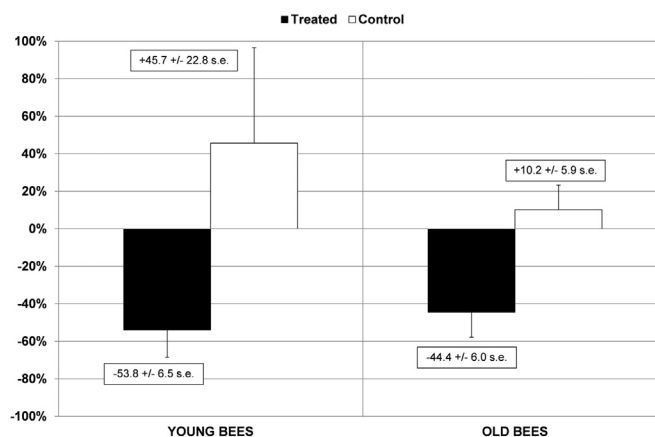


Fig. 3. Relative change of prevalence measured in the pre–post-treatment period: average (white: untreated; black: treated) and standard deviation (pins).



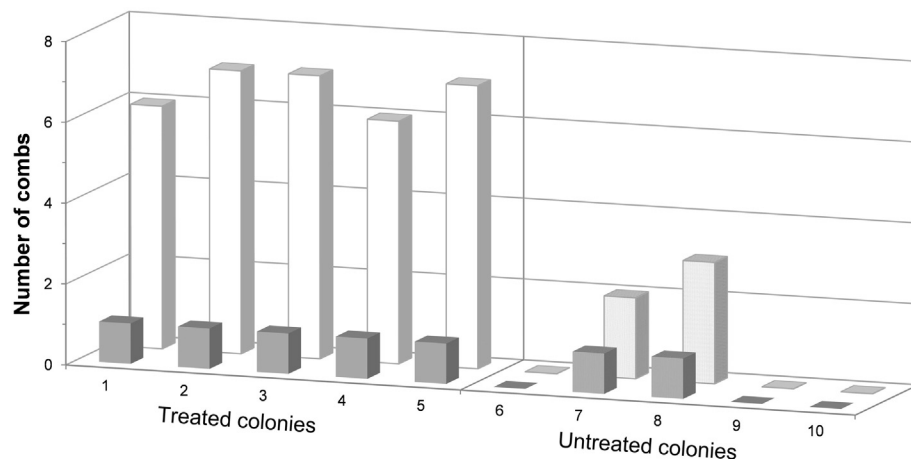


Fig. 4. Number of combs with bees (background columns) and brood (foreground) at the post-winter check.

The mode of action of oxalic acid against *N. ceranae* is still unknown and should be elucidated by taking into consideration the eminent chemical characteristics of the substance. In effect, the high dissociation constant and the aptitude to chelating metallic cations might change the chemical environment of the ventriculum, impairing the intraluminal cycle of the parasite. Our results make realistic the future availability of double action medicaments, controlling both *N. ceranae* and *V. destructor*.

The fact that oxalic acid is unevenly used to treat *Varroa* infestations in different regions might explain conflicting records on the importance of *N. ceranae* on honey bee health (Dainat et al., 2012; Gisder et al., 2010; Hatjina et al., 2011; Huang et al., 2012; Martínez et al., 2012; Martín-Hernández et al., 2012).

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Acknowledgements

Technical support was provided by J. Almagro, J. García, V. Albendea, T. Corrales, C. Uceta, M. Gajero.

The study was funded by INIA-FEDER, Projects RTA2012-00076-C02-01 and RTA-2013-00042-C10-06.

#### References

- Bacandritsos, N., Granato, A., Budge, G., Papanastasiou, I., Roinioti, E., Caldon, M., Falcaro, C., Gallina, A., Mutinelli, F., 2010. Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies. *J. Invertebr. Pathol.* 105, 335–340. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2010.08.004>.
- Bekele, A.Z., Mor, S.K., Phelps, N.B.D., Goyal, S.M., Armien, A.G., 2015. A case report of *Nosema ceranae* infection in honey bees in Minnesota, USA. *Vet. Q.* 35, 48–50. <http://dx.doi.org/10.1080/01652176.2014.981766>.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Garrido-Bailón, E., Nanetti, A., Meana, A., Higes, M., 2012. *Nosema* spp. parasitization decreases the effectiveness of acaricidal strips (Apivar®) in treating varroosis of honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Environ. Microbiol. Rep.* 4, 57–65. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00299.x>.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Meana, A., Higes, M., 2013. *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Vet. Res.* 44, 1–15. <http://dx.doi.org/10.1186/1297-9716-44-25>.
- Bromenshenk, J.J., Henderson, C.B., Wick, C.H., Stanford, M.F., Zulich, A.W., Jabbour, R.E., Deshpande, S.V., McCubbin, P.E., Seccomb, R.A., Welch, P.M., Williams, T., Firth, D.R., Skowronski, E., Lehmann, M.M., Bilimoria, S.L., Gress, J., Wanner, K.W., Cramer Jr., R.A., 2010. Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. *PLoS ONE* 5, e13181. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0013181>.
- Chen, Y.-W., Chung, W.-P., Wang, C.-H., Solter, L.F., Huang, W.-F., 2012. *Nosema ceranae* infection intensity highly correlates with temperature. *J. Invertebr. Pathol.* 111, 264–267. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2012.08.014>.
- Dainat, B., vanEngelsdorp, D., Neumann, P., 2012. Colony collapse disorder in Europe. *Environ. Microbiol. Rep.* 4, 123–125. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00312.x>.
- Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Crauser, D., Beslay, D., Costagliola, G., Soubeyrand, S., Kretzschmar, A., Le Conte, Y., 2013. Flight behavior and pheromone changes associated to *Nosema ceranae* infection of honey bee workers (*Apis mellifera*) in field conditions. *J. Invertebr. Pathol.* 113, 42–51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2013.01.002>.
- Fries, I., 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 103, S73–S79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.017> (Supplement).
- Gisder, S., Hedtke, K., Möckel, N., Frielitz, M.-C., Linde, A., Genersch, E., 2010. Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3032–3038. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.03097-09>.
- Goblirsch, M., Huang, Z.Y., Spivak, M., 2013. Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. *PLoS ONE* 8, e58165. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0058165>.



Fig. 5. Conditions of the untreated colonies that were found dead (above) and weak (below) at the post-winter check.



- Gregorc, A., Škerl, M.I.S., 2007. Toxicological and immunohistochemical testing of honeybees after oxalic acid and rotenone treatments. *Apidologie* 38, 296–305. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2007014>.
- Hatjina, F., Tsoktouridis, G., Bouga, M., Charistos, L., Evangelou, V., Avtzi, D., Meeus, I., Brunain, M., Smagghe, G., de Graaf, D.C., 2011. Polar tube protein gene diversity among *Nosema ceranae* strains derived from a Greek honey bee health study. *J. Invertebr. Pathol.* 108, 131–134. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2011.07.003>.
- Hedtke, K., Jensen, P.M., Jensen, A.B., Genersch, E., 2011. Evidence for emerging parasites and pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalkbrood. *J. Invertebr. Pathol.* 108, 167–173. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2011.08.006>.
- Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., Meana, A., 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J. Invertebr. Pathol.* 94, 211–217. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2006.11.001>.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E.G., González-Porto, A.V., Barrios, L., del Nozal, M.J., Bernal, J.L., Jiménez, J.J., Palencia, P.G., Meana, A., 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ. Microbiol.* 10, 2659–2669. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x>.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Meana, A., 2010. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* 41, 375–392. <http://dx.doi.org/10.1051/apido/2010019>.
- Higes, M., Meana, A., Bartolomé, C., Botías, C., Martín-Hernández, R., 2013. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 17–29. <http://dx.doi.org/10.1111/1758-2229.12024>.
- Huang, Q., Kryger, P., Le Conte, Y., Moritz, R.F.A., 2012. Survival and immune response of drones of a nosemosis tolerant honey bee strain towards *N. ceranae* infections. *J. Invertebr. Pathol.* 109, 297–302. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2012.01.004>.
- Martínez, J., Leal, G., Conget, P., 2012. *Nosema ceranae* an emergent pathogen of *Apis mellifera* in Chile. *Parasitol. Res.* 111, 601–607. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-012-2875-0>.
- Martín-Hernández, R., Botías, C., Barrios, L., Martínez-Salvador, A., Meana, A., Mayack, C., Higes, M., 2011. Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitol. Res.* 109, 605–612. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-011-2292-9>.
- Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E.G., Martínez-Salvador, A., Prieto, L., Meana, A., Higes, M., 2012. Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environ. Microbiol.* 14, 2127–2138. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02645.x>.
- Meana, A.M., Martín-Hernández, R., Higes, M., 2010. The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees. *J. Apic. Res.* 49, 212–214. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.49.2.12>.
- Milani, N., 2001. Activity of oxalic acid and citric acids on the mite *Varroa destructor* in laboratory assays. *Apidologie* 32, 127–128.
- Nanetti, A., Stradi, G., 1997. Varroasi: trattamento chimico con acido ossalico in sciroppo zuccherino. *Ape Nostra Amica* 19, 6–14.
- Nanetti, A., Büchler, R., Charriere, J.-D., Fries, I., Helland, S., Imdorf, A., Korpela, S., Kristiansen, P., 2003a. Oxalic acid treatments for varroa control (review). *Apiacta* 38, 81–83.
- Nanetti, A., Bartolomei, P., Bellato, S., De Salvio, M., Gattavecchia, E., Ghini, S., 2003b. Pharmacodynamics of oxalic acid in the honey bee colony. Presented at the 38th Apimondia International Congress, Apimondia, Ljubljana (Slovenia).
- Natsopoulos, M.E., McMahon, D.P., Doublet, V., Bryden, J., Paxton, R.J., 2015. Interspecific competition in honeybee intracellular gut parasites is asymmetric and favours the spread of an emerging infectious disease. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 282, 20141896. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2014.1896>.
- Schneider, S., Eisenhardt, D., Rademacher, E., 2012. Sublethal effects of oxalic acid on *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae): changes in behaviour and longevity. *Apidologie* 43, 218–225. <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-011-0102-0>.
- Snedecor, G.W., Cochran, W.G., 1967. Statistical Methods, Sixth Edition. ed. The Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
- Soroker, V., Hetzroni, A., Yakobson, B., David, D., David, A., Voet, H., Slabezki, Y., Efrat, H., Levski, S., Kamer, Y., Klinberg, E., Zioni, N., Inbar, S., Chejanovsky, N., 2011. Evaluation of colony losses in Israel in relation to the incidence of pathogens and pests. *Apidologie* 42, 192–199. <http://dx.doi.org/10.1051/apido/2010047>.
- Stevanovic, J., Stanimirovic, Z., Genersch, E., Kovacevic, S.R., Ljubenkovic, J., Radakovic, M., Aleksic, N., 2011. Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie* 42, 49–58. <http://dx.doi.org/10.1051/apido/2010034>.
- Suwannapong, G., Yemor, T., Boonpakdee, C., Benbow, M.E., 2011. *Nosema ceranae*, a new parasite in Thai honeybees. *J. Invertebr. Pathol.* 106, 236–241. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2010.10.003>.



Short communication:

Survival of honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Crithidia mellificae* (Langridge and McGhee: ATCC®30254™) in the presence of *Nosema ceranae*.

Higes M, Rodríguez-García C, Gómez-Moracho T, Meana A, Bartolomé C, Maside X, Barrios L, Martín-Hernández R.

Spanish Journal of Agricultural Research, 2016;14(3): e05SC02

Contribución en este trabajo:

Durante el periodo de mi tesis doctoral nuevos patógenos, como los tripanosomátidos, estaban tomando un papel relevante en la muerte de las colonias. De manera que junto con los análisis de presencia del tripanosomátido *Crithidia mellificae* en el ensayo de campo descrito en esta memoria, se realizó este ensayo en paralelo para solventar las dudas sobre la patogenicidad que este parásito estaba creando. De forma que mi contribución en este análisis consistió principalmente en el manejo experimental del ensayo como: infecciones experimentales, toma de muestras y análisis moleculares.





## SHORT COMMUNICATION

## OPEN ACCESS

## Survival of honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Crithidia mellificae* spheroid forms (Langridge and McGhee: ATCC® 30254™) in the presence of *Nosema ceranae*

Mariano Higes<sup>1</sup>, Cristina Rodríguez-García<sup>1</sup>, Tamara Gómez-Moracho<sup>1</sup>, Aranzazu Meana<sup>2</sup>, Carolina Bartolomé<sup>3,4</sup>, Xulio Maside<sup>3,4,5</sup>, Laura Barrios<sup>6</sup>, and Raquel Martín-Hernández<sup>1,7</sup>

<sup>1</sup> Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, IRIAF, Centro de Investigación Apícola y Agroambiental (CIAPA), Laboratorio de Patología Apícola, 19180 Marchamalo (Guadalajara). Spain. <sup>2</sup> Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Departamento de Sanidad Animal, 28040 Madrid. Spain. <sup>3</sup> Universidade de Santiago de Compostela, CIMUS, Medicina Xenómica, 15782 Santiago de Compostela. Spain. <sup>4</sup> IDIS, Xenómica Comparada de Parásitos Humanos, Santiago de Compostela. Spain. <sup>5</sup> Universidade de Santiago de Compostela, Departamento de Anatomía Patolóxica e Ciencias Forenses, 15782 Santiago de Compostela. Spain. <sup>6</sup> Consejo Superior Investigaciones Científicas, SGA1. Departamento de Estadística, 28006 Madrid. Spain. <sup>7</sup> Fundación Parque Científico y Tecnológico de Albacete, Instituto de Recursos Humanos para la Ciencia y la Tecnología (INCRECYT), Albacete, Spain

### Abstract

*Crithidia mellificae*, a trypanosomatid parasite of *Apis mellifera*, has been proposed to be one of the pathogens responsible for the serious honey bee colony losses produced worldwide in the last decade, either alone or in association with *Nosema ceranae*. Since this pathogenic effect contradicts the results of the experimental infections originally performed by Langridge and McGhee nearly 40 years ago, we investigated the potential linkage of this protozoan with colony decline under laboratory conditions. *Nosema*-free and trypanosomatid-free honey bees from three different colonies were experimentally infected with fresh *C. mellificae* spheroid forms (reference strain ATCC30254), with *N. ceranae* fresh spores and with both parasites at the same time. Replicate cages were kept at 27 °C and used to analyse survival. *C. mellificae* spheroid forms did not reduce significantly the survival of the worker bees (64.5% at 30 days post-infection vs. 77.8% for the uninfected bees used as controls; differences were non statistically significant) under these experimental conditions. In contrast, the cages infected with *N. ceranae* exhibited higher rates of mortality from the 20th day post-infection onwards, irrespective of the presence of *C. mellificae*, suggesting that the spheroid forms of the latter have no pathological effect on *A. mellifera*.

**Additional key words:** trypanosomatids; microsporidia, colony collapse.

**Abbreviations used:** CCD (colony collapse disorder), dpi (days post-infection), PCR (polymerase chain reaction).

**Authors' contributions:** Conceived and designed the experiments: MH, RMH, AM and CB. Performed the experiments: MH, CRG, TGM and RMH. Analyzed the data: MH, RMH, AM, CB, XM and LB. Statistical analysis: LB. Coordinating the research project: MH. Wrote the paper: MH, RMH, XM and CB.

**Citation:** Higes, M.; Rodríguez-García, C.; Gómez-Moracho, T.; Meana, A.; Bartolomé, C.; Maside, X.; Barrios, L.; Martín-Hernández, R. (2016). Short communication: Survival of honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Crithidia mellificae* (Langridge and McGhee: ATCC® 30254™) in the presence of *Nosema ceranae*. Spanish Journal of Agricultural Research, Volume 14, Issue 3, e05SC02. <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2016143-8722>.

**Received:** 30 Sep 2015. **Accepted:** 29 Jun 2016.

**Copyright** © 2016 INIA. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial (by-nc) Spain 3.0 Licence, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Funding:** INIA-FEDER (RTA2013-00042-C10-06 and E-RTA2014-00003-C03).

**Competing interests:** None of the authors of this paper has any financial or personal relationship with other individuals or organizations that could have inappropriately influenced or bias the content of the paper. The authors declare that they have no competing interests.

**Correspondence** should be addressed to Mariano Higes: [mhiges@jccm.es](mailto:mhiges@jccm.es)

### Introduction

In the last decade, the phenomenon of honey bee colony death has attracted the interest of scientists, beekeepers and the general public alike. Increased annual honey bee colony losses have been associated with many factors, including viruses, bacteria, fungi,

mites and trypanosomatids (Higes *et al.*, 2006; vanEngelsdorp *et al.*, 2009; Cox-Foster *et al.*, 2007; Dainat *et al.*, 2012; Francis *et al.*, 2013; Ravoet *et al.*, 2013; Cepero *et al.*, 2014). Trypanosomatids are flagellated protozoan parasites and they are the direct descendants of the first eukaryotes that appeared on the earth ~1.5 billion years ago (Knoll, 1992). Several genera

of the Trypanosomatidae cause disease in humans, domestic animals, plants (Galanti *et al.*, 1998) and insects (Schmid-Hempel & Tognazzo, 2010). Indeed, the interest in insect trypanosomatids, especially those affecting bees, has increased among researchers due to their possible involvement in colony collapse disorder (CCD). Until now honey bees were thought to be infected by only a single trypanosomatid species, *Crithidia mellificae*, the trypanosomatid first detected in Australia during the diagnostic examination of *Apis mellifera* apiaries (Langridge & McGhee, 1967). The original experimental infection with *C. mellificae* suggested it had no pathological effects on this hymenopteran host, which explains why this organism has been largely ignored for more than 40 years.

However, a relationship between *C. mellificae* infection and colony losses was recently proposed in the USA (Runckel *et al.*, 2011) and Belgium (Ravoet *et al.*, 2013). Indeed, *C. mellificae* was 6.15-fold more abundant in CCD-affected colonies than in unaffected colonies in a colony-cohort study, and its detection was strongly associated with the presence of *N. ceranae* (Runckel *et al.*, 2011). In addition, a high prevalence of *C. mellificae* (70.5%) was reported in Belgium (Ravoet *et al.*, 2013), and a correlation was detected between *C. mellificae* incidence in July and winter mortality. This study also confirmed the link between *C. mellificae* and *N. ceranae* previously described in the USA (Runckel *et al.*, 2011), suggesting that co-infection by these pathogens has a negative synergistic impact on colony longevity (Ravoet *et al.*, 2013). More recently, a holistic screening of professional apiaries with typical honey bee depopulation symptoms in Spain (Cepero *et al.*, 2014) revealed a higher prevalence of *N. ceranae* with only a moderate presence of trypanosomatids. Genetic analyses of the 18S rDNA and GAPDH sequences of these trypanosomatids proved that they were phylogenetically distant from those of the reference ATCC30254 *C. mellificae* strain, providing the first hard evidence of honey bee infection by a different lineage (Cepero *et al.*, 2014). The existence of this taxon, which was later named *Lotmaria passim* (Schwarz *et al.*, 2015), had been previously suggested in the USA (Cornman *et al.*, 2012). It is also worth noting that all the sequences attributed to *C. mellificae* until then, including its draft genome assembly (Runckel *et al.*, 2014), were more closely related to this new taxon than to the “true” *C. mellificae* (Cepero *et al.*, 2014).

Together, these studies inspired renewed interest in this pathogen and its relationship with the highly prevalent microsporidium *N. ceranae* as one of the possible causes of bee colony collapse in different parts

of the world. Given the discrepancies regarding the pathological effect of *C. mellificae* in honey bees (Langridge & McGhee, 1967; Ravoet *et al.*, 2013), we evaluated the effect of experimentally infecting bee colonies under laboratory conditions with the *C. mellificae* ATCC30254 reference strain, with or without *N. ceranae*. In this way we were able to specifically assess the influence of *C. mellificae* on the bees’ life expectancy and determine whether a synergistic effect of this pathogen with *N. ceranae* could be detected.

## Material and methods

To perform these experiments, the *C. mellificae* reference strain ATCC30254 was first cultured in ATCC medium 355 as recommended, and it was further sub-cultured in solid medium as described by Popp & Lattorff (2011). Visible, isolated colonies were selected and resuspended in milliQ water (PCR-quality) to obtain trypanosomatid spheroid forms for experimental infection (Schwarz & Evans, 2013). The DNA from those colonies was extracted as described previously in Cepero *et al.* (2014) and the trypanosomatid species was confirmed by PCR (Meeus *et al.*, 2010) and subsequent sequencing (Cepero *et al.*, 2014). Freshly purified *N. ceranae* spores for experimental infection were obtained as described elsewhere (Martín-Hernández *et al.*, 2011, 2012; Higes *et al.*, 2013), counting both the *N. ceranae* spores and *C. mellificae* spheroid forms in a haemocytometer. DNA was extracted from an aliquot of *Nosema* spores to confirm the species by PCR (Martín-Hernández *et al.*, 2012). *Nosema*-free and trypanosomatid-free honey bees were obtained as described previously (Higes *et al.*, 2013). Emerging worker bees from three different colonies were removed carefully, confined to cages in groups of 25 and kept in the incubator for 5 days at 27°C, the optimum temperature for *C. mellificae* growth (Langridge & McGhee, 1967). Sixteen replicate cages were prepared, 12 of which were used to analyse survival: three cages infected with fresh *N. ceranae* spores; three with fresh *C. mellificae* spheroid forms; three co-infected with *N. ceranae* and *C. mellificae*; and three that remained uninfected (used as controls).

Honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) were infected as described elsewhere (Higes *et al.*, 2013), administering 1 µL of a sucrose solution containing 50,000 *N. ceranae* spores or 50,000 *C. mellificae* spheroid forms. The co-infected bees received 1 µL of each pathogen solution, while uninfected control bees were fed with 2 µL of the 50% sucrose solution alone. After inducing infection, the bees in each cage

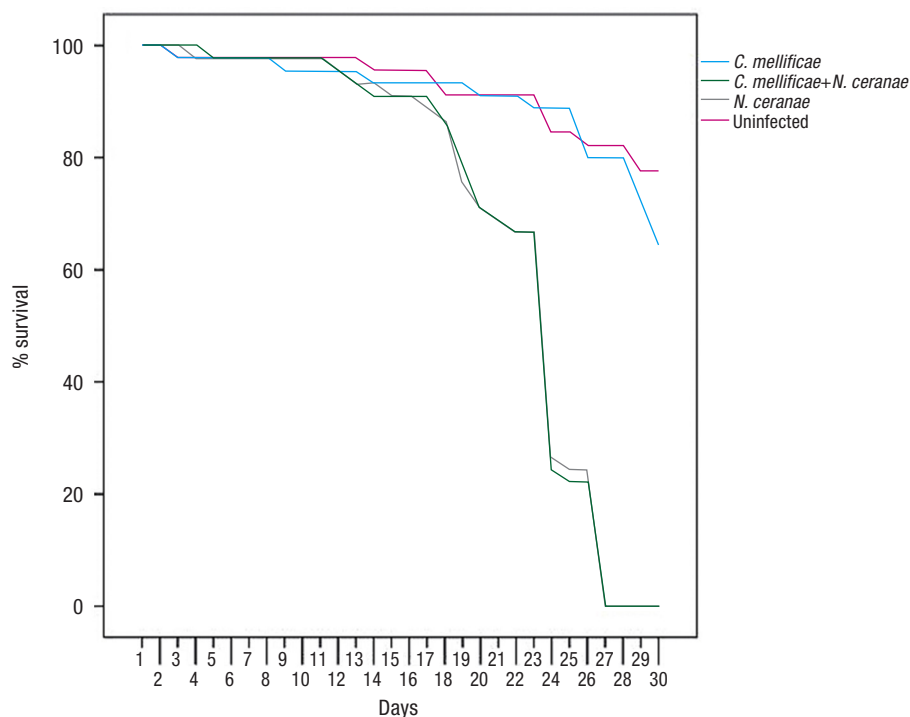
were fed ad libitum with 50% sugar syrup + 2% Promotor L (Calier Lab). Infected and uninfected bees were kept at 27 °C in separate incubators (Memmert ® Mod. IPP500, 0.1 °C), and the replicate cages were observed daily. Cumulative honey bee mortality was analysed using a Kaplan-Meier Log-Rank survival analysis and the slope of the survival function was analysed according to the Mantel-Cox test with the aid of IBM Statistics V22.0.

## Results and discussion

The mortality of the workers infected with *N. ceranae* and *N. ceranae*+*C. mellificae* was significantly higher than that of those that received the *C. mellificae* treatment alone and that of the control worker bees. Bee survival at 30 days post-infection (dpi) was 77.8%, 64.5%, 0% and 0% for the uninfected control honey bees, and the honey bees from cages infected with *C. mellificae*, *N. ceranae* and a mixture of both parasites, respectively (Fig. 1). The mortality of the workers infected with *N. ceranae* and *N. ceranae*+*C. mellificae* was significantly higher than that of those that received *C. mellificae* alone and that of the control worker bees (Kaplan-Meier Long-Rank test,  $p<0.001$ ). Conversely, the survival of the control and the *C. mellificae* infected bees was significantly higher than that of the

other two groups (Kaplan-Meier Long-Rank test,  $p<0.001$ ). The slopes of the survival functions were statistically different according to the Mantel-Cox test ( $p<0.05$ ). The evolution of control worker bee survival was similar and not significantly different from that of those infected with *C. mellificae* alone ( $p>0.05$ ). Likewise, the *N. ceranae* and mixed infection groups also displayed a parallel evolution in terms of survival ( $p>0.05$ ), which differed considerably from the other two groups from 20 dpi onwards. The highest mortality rates of worker honey bees occurred in the cages infected with *N. ceranae*, irrespective of the presence of *C. mellificae*.

Since the first report of *N. ceranae* infecting of *A. mellifera* bees there has been some controversy about the effects of these microsporidia. However, most of the studies published in recent years have confirmed that *N. ceranae* has a pathogenic effect on this host, expressed as a shortening of the honey bee (workers) lifespan (Higes *et al.*, 2013). Significantly, the longevity of infected bees varies strongly among these studies, probably due to the many factors that influence the development and the course of the infection. For example, this is the case of the temperature, which must be taken into consideration in laboratory studies since *N. ceranae* has been proposed to be eurithermal (Higes *et al.*, 2010). In this study, the survival of honey bees following experimental infec-



**Figure 1.** Cumulative honey bee mortality after infection with *Crithidia mellificae*, *Nosema ceranae* and *N. ceranae*+*C. mellificae* or uninfected (Control).



tion with *N. ceranae* is consistent with that seen previously (reviewed by Higes *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2015; Milbrath *et al.*, 2015), confirming that bees infected with *N. ceranae* have a shorter life expectancy than uninfected bees. The incubation temperature used may explain the distinct evolution in the survival of infected honey bees relative to other laboratory experiments performed in our laboratory (Martín-Hernández *et al.*, 2009).

Previous co-infection experiments with *N. ceranae* and *C. mellificae* under laboratory conditions have shown to modify the bees's immune response in a distinct manner to that produced when bees were exposed only to one pathogen or another. Mixed *C. mellificae* and *N. ceranae* infection altered the repertoire of systemic antimicrobial peptides and reduced cellular immunity at the level of the immune response, although the mortality of the infected bees was not recorded (Schwarz & Evans, 2013). An epidemiological link between the presence of *C. mellificae* and bee colony collapse has been suggested in field conditions, either alone or in association with *N. ceranae* (Runckel *et al.*, 2011; Ravoet *et al.*, 2013), although no information regarding worker bee mortality was reported. The effect of the infection with *C. mellificae* spheroid forms on honey bee survival suggests that such cellular stage does not alter the insect's longevity, and does not significantly modify the mortality of bees co-infected with *N. ceranae* when compared to that of the bees infected with the microsporidium alone. These results are consistent with those of Langridge & McGhee (1967) suggesting that *C. mellificae* has no pathological effect on honey bees. However, further research is needed to determine the development of this trypanosomatid in different culture media, investigate its life cycle and the possible variability of its pathogenic capacity. The finding of a new trypanosomatid taxon in collapsed colonies under field conditions raises new questions about the role of *C. mellificae* in honey bee losses, an issue that should be addressed through appropriate experimental infection and epidemiological analyses.

## Acknowledgments

The authors wish to thank J. Almagro, J. García, V. Albendea, C. Uceta, M. Gajero and T. Corrales at Laboratorio de Patología Apícola, Centro de Investigación Apícola y Agroambiental (CIAPA), IRIAF, Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha for their technical support. We also thank Prof. de Graaf and

Dr. Ravoet for supplying the ATCC30254 reference strain and for sharing their knowledge about *C. mellificae*.

## References

- Cepero A, Gómez-Moracho T, Bernal JL, Del Nozal MJ, Bartolomé C, Maside X, Meana A, González-Porto AV, de Graaf DC, Martín-Hernández R, Higes M, 2014. Holistic screening of collapsing honey bee colonies in Spain: a case study. BMC Research Notes 7: 649. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-0500-7-649>.
- Cornman RS, Tarpy DR, Chen Y, Jeffreys R, Lopez D, Pettis JS, vanEngelsdorp D, Evans JD, 2012. Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. PLOS ONE 8: e43652. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0043562>.
- Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes E., Palacios E, Evans JD, *et al.*, 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. Science 318: 283-287. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1146498>.
- Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L, Neumann P, 2012. Predictive markers of honey bee colony collapse. PLOS ONE 7(2): e32151. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0032151>.
- Francis RM, Nielsen SL, Kryger P, 2013. Varroa-virus interaction in collapsing honey bee colonies. PLOS ONE 8(3): e57540. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0057540>.
- Galanti N, Galindo M, Sabaj V, Espinoza I, Toro G, 1998. Histone genes in trypanosomatids. Parasitol Today 14: 64-70. [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-4758\(97\)01162-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-4758(97)01162-9).
- Higes M, Martín-Hernández R, Meana A, 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. J Invertebr Pathol 92: 93-95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2006.02.005>.
- Higes M, García-Palencia P, Botías C, Meana A, Martín-Hernández R, 2010. The differential development of microsporidia infecting worker honey bee (*Apis mellifera*) at increasing incubation temperature. Environ Microbiol Rep 2: 745-748. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00170.x>.
- Higes M, Juarranz Á, Dias-Almeida J, Lucena S, Botías C, Meana A, García-Palencia P, Martín-Hernández R, 2013. Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*). Environ Microbiol Rep 5(4): 530-536. <http://dx.doi.org/10.1111/1758-2229.12059>.
- Huang WF, Solter L, Aronstein K, Huang Z, 2015. Infectivity and virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in commercially available North American honey bees. Invertebr Pathol 124: 107-113. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2014.10.006>.
- Knoll AJ, 1992. The early evolution of eukaryotes: a geological perspective. Science 256: 622-627. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1585174>.
- Langridge D, McGhee R, 1967. *Crithidia mellificae* n. sp. An acidophilic trypanosomatid of the honey bee *Apis mellifera*. J Protozool 14(3): 485-487. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.1967.tb02033.x>.

- Martín-Hernández R, Meana A, García-Palencia P, Marín P, Botías C, Garrido-Bailó E, Barrios L, Higes M, 2009. Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *Appl Environ Microbiol* 75 (8): 2554-2557. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02908-08>.
- Martín-Hernández R, Botías C, Barrios L, Martínez-Salvador A, Meana A, Mayack C, Higes M, 2011. Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honey bees (*Apis mellifera*). *Parasitol Res* 109: 605-612. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-011-2292-9>.
- Martín-Hernández R, Botías C, Garrido Bailón E, Martínez-Salvador A, Prieto L, Meana A, Higes M, 2012. Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environ Microbiol* 14 (8): 2127-2138. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02645.x>.
- Meeus I, De Graaf DC, Jans K, Smagghe G, 2010. Multiplex PCR detection of slowly-evolving trypanosomatids and neogregarines in bumblebees using broad-range primers. *J Appl Microbiol* 109: 107-115.
- Milbrath MO, van Tran T, Huang W-F, Solter L F, Tarpay DR, Lawrence F, Huang Z, 2015. Comparative virulence and competition between *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol* 125: 9-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2014.12.006>.
- Popp M, Lattorff HMG, 2011. A quantitative in vitro cultivation technique to determine cell number and growth rates in strains of *Crithidia bombi* (Trypanosomatidae), a parasite of bumblebees. *J Eukaryotic Microbiol* 58: 7-10. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.2010.00514.x>.
- Ravoet J, Maharramov J, Meeus I, De Smet L, Wenseleers T, Smagghe G, de Graaf DC, 2013. Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellifica* as a new contributory factor to winter mortality. *PLOS ONE* 8: e72443. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0072443>.
- Ravoet J, Schwarz RS, Descamps T, Ya-ez O, Torkaz OC, Martín-Hernández R, Bartolomé C, De Smet L, Higes M, Wenseleers T, Schmid-Hempel R, Neuman P, Kadowaki T, Evans JD, de Graaf D, 2015. Differential diagnosis of the honey bee trypanosomatids *Crithidia mellifica* and *Lotmaria passim*. *J Invertebr Pathol* 130: 21-27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.06.007>.
- Runckel C, Flenniken M, Engel JC, Ruby JG, Ganem D, Andino R, DeRisi JL, 2011. Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PLoS ONE* 6: e20656. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0020656>.
- Runckel C, DeRisi J, Flenniken ML, 2014. A draft genome of the honey bee trypanosomatid parasite *Crithidia mellifica*. *PLOS ONE* 9: e95057. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0095057>.
- Schmid-Hempel R, Tognazzo M, 2010. Molecular divergence defines two distinct lineages of *Crithidia bombi* (Trypanosomatidae), parasites of bumblebees. *J Eukaryotic Microbiol* 57 (4): 337-345. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.2010.00480.x>.
- Schwarz RS, Evans JD, 2013. Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honey bees. *Dev Comp Immunol* 40 (3-4): 300-310. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2013.03.010>.
- Schwarz RS, Bauchan G., Murphy CA, Ravoet J, De Graaf DC, Evans JD, 2015. Characterization of two species of trypanosomatidae from the honey bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellifica* Langridge and McGhee, 1967 and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp. *J Eukaryotic Microbiol* 10: 1-17.
- Vanengelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haugbruge E, Nguyen BK, Frazier M, Frazier J, Cox-Foxter D, Chen Y *et al.*, 2009. Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS ONE* 4: e6481. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>.
- Williams GR, Shutler D, Burgher-MacLellan K., Rogers RE, 2014. Infra-population and community dynamics of the parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, and consequences for honey bee (*Apis mellifera*) hosts. *PLOS ONE* 9: e99465. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0099465>.





**Silencing the honey bee (*Apis mellifera*) naked cuticle gene (*nkd*) improves host immune function and reduces *Nosema ceranae* infections.**

Li W, Evans JD, Huang Q, Rodríguez-García C, Liu J, Hamilton M, Grozinger CM, Webster TC, Su S, Chen YP.

Applied Environmental Microbiology. 2016; 82: 6779–6787

Contribución en este trabajo:

Durante la estancia realizada en el *United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service (USDA-ARS) Bee Research Laboratory, Beltsville en Maryland, EEUU*, me incorporé en el *Nosema Project* del que forma parte el trabajo presentado en esta publicación. Mi contribución en este trabajo consistió en la purificación de esporas de *Nosema ceranae*, infección experimental y recogida de datos. Todo ello a su vez, me sirvió como aprendizaje para la puesta a punto del ensayo descrito en el capítulo III.B.



# Silencing the Honey Bee (*Apis mellifera*) Naked Cuticle Gene (*nkd*) Improves Host Immune Function and Reduces *Nosema ceranae* Infections

Wenfeng Li,<sup>a</sup> Jay D. Evans,<sup>a</sup> Qiang Huang,<sup>a,b</sup> Cristina Rodríguez-García,<sup>c</sup> Jie Liu,<sup>a</sup> Michele Hamilton,<sup>a</sup> Christina M. Grozinger,<sup>d</sup> Thomas C. Webster,<sup>e</sup> Songkun Su,<sup>f</sup> Yan Ping Chen<sup>a</sup>

USDA-ARS Bee Research Laboratory, Beltsville, Maryland, USA<sup>a</sup>; Institute of Bee Health, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Bern, Switzerland<sup>b</sup>; Centro Apícola de Marchamalo (IRIAF), Marchamalo, Guadalajara, Spain<sup>c</sup>; Department of Entomology, Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, USA<sup>d</sup>; College of Agriculture, Food Science and Sustainable Systems, Kentucky State University, Frankfort, Kentucky, USA<sup>e</sup>; College of Bee Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, China<sup>f</sup>

## ABSTRACT

*Nosema ceranae* is a new and emerging microsporidian parasite of European honey bees, *Apis mellifera*, that has been implicated in colony losses worldwide. RNA interference (RNAi), a posttranscriptional gene silencing mechanism, has emerged as a potent and specific strategy for controlling infections of parasites and pathogens in honey bees. While previous studies have focused on the silencing of parasite/pathogen virulence factors, we explore here the possibility of silencing a host factor as a mechanism for reducing parasite load. Specifically, we used an RNAi strategy to reduce the expression of a honey bee gene, *naked cuticle* (*nkd*), which is a negative regulator of host immune function. Our studies found that *nkd* mRNA levels in adult bees were upregulated by *N. ceranae* infection (and thus, the parasite may use this mechanism to suppress host immune function) and that ingestion of double-stranded RNA (dsRNA) specific to *nkd* efficiently silenced its expression. Furthermore, we found that RNAi-mediated knockdown of *nkd* transcripts in *Nosema*-infected bees resulted in upregulation of the expression of several immune genes (*Abaecin*, *Apidaecin*, *Defensin-1*, and *PGRP-S2*), reduction of *Nosema* spore loads, and extension of honey bee life span. The results of our studies clearly indicate that silencing the host *nkd* gene can activate honey bee immune responses, suppress the reproduction of *N. ceranae*, and improve the overall health of honey bees. This study represents a novel host-derived therapeutic for honey bee disease treatment that merits further exploration.

## IMPORTANCE

Given the critical role of honey bees in the pollination of agricultural crops, it is urgent to develop strategies to prevent the colony decline induced by the infection of parasites/pathogens. Targeting parasites and pathogens directly by RNAi has been proven to be useful for controlling infections in honey bees, but little is known about the disease impacts of RNAi silencing of host factors. Here, we demonstrate that knocking down the honey bee immune repressor-encoding *nkd* gene can suppress the reproduction of *N. ceranae* and improve the overall health of honey bees, which highlights the potential role of host-derived and RNAi-based therapeutics in controlling the infections in honey bees. The information obtained from this study will have positive implications for honey bee disease management practices.

European honey bees, *Apis mellifera*, play a critical role in the pollination of important crops. However, honey bee populations have suffered high losses in much of the world (1), coincident with an increase in agricultural demand for honey bee pollination (2). Specifically, honey bee colony losses in the United States have been exacerbated since the report of colony collapse disorder (CCD), a syndrome that comprises large-scale, unexplained losses of managed honey bees (3–9). High levels of parasites and pathogens have been linked to the decline of honey bee colonies (10, 11).

*Nosema* is a genus of obligate, intracellular microsporidian parasites that infect many diverse animal species, including honey bees (12, 13). For years, *Nosema* disease of European honey bees was exclusively attributed to a single *Nosema* species, *Nosema apis*. Another species, *Nosema ceranae*, was originally detected in Asian honey bees, *Apis cerana* (14), and subsequently found to infect European honey bees, *A. mellifera* (15, 16). Since then, the infection of *A. mellifera* by *N. ceranae* has been reported worldwide (17–20), and nosemosis of *A. mellifera* caused by *N. ceranae* is now far more prevalent than that by its native sympatric congener *N.*

*apis* (17, 21–25). Although there are no outward disease symptoms reported (12), *N. ceranae* infection can cause energetic stress and behavioral changes in worker bees (26–29), leading to a reduced life span of infected bees. As an emerging parasite, *N. ceranae* has often been linked to colony losses worldwide. A study based on Spanish honey bee populations showed that natural in-

Received 15 July 2016 Accepted 6 September 2016

Accepted manuscript posted online 9 September 2016

Citation Li W, Evans JD, Huang Q, Rodríguez-García C, Liu J, Hamilton M, Grozinger CM, Webster TC, Su S, Chen YP. 2016. Silencing the honey bee (*Apis mellifera*) naked cuticle gene (*nkd*) improves host immune function and reduces *Nosema ceranae* infections. Appl Environ Microbiol 82:6779–6787. doi:10.1128/AEM.02105-16.

Editor: H. L. Drake, University of Bayreuth

Address correspondence to Yan Ping Chen, judy.chen@ars.usda.gov.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02105-16>.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

fection by *N. ceranae* could cause colony collapse (30, 31). New evidence has shown that *N. ceranae* interacts synergistically with pesticides, resulting in more complex and severe disease in honey bees (32–35). So far, the only registered treatment for nosemosis in North America is fumagillin. With prolonged use of fumagillin, the issues of drug resistance have arisen (36). As a result, novel parasite-specific and environmentally friendly therapeutic options are urgently needed for *Nosema* treatment.

RNA interference (RNAi), a posttranscriptional gene silencing mechanism, is an efficient and specific method of gene silencing which functions by inducing degradation of homologous mRNAs (37, 38). RNAi technology has been explored to protect honey bees from infection by pathogens and parasites (39). Three honey bee viruses, Israeli acute paralysis virus (IAPV), deformed wing virus (DWV), and Chinese sacbrood virus (CSBV), have been successfully inhibited by RNAi under laboratory conditions by feeding bees with virus-specific double-stranded RNAs (dsRNAs) or small interfering RNAs (siRNAs) (40–43). Moreover, a large-scale field application of IAPV dsRNA improved bee survival, colony size, and honey yield (44). RNAi has also been used to help control the parasitic mite *Varroa destructor* (45). In one previous study, *N. ceranae* ADP/ATP transporter genes were targeted and silenced by corresponding dsRNAs, resulting in the decline of spore loads and alleviation of disease in infected bees (46).

All applications of RNAi in treating honey bee diseases to date have targeted the genes of parasites or pathogens. Nevertheless, disease always involves interactions between hosts and parasites/pathogens, and it is also possible to mitigate infections from the host perspective, i.e., to use RNAi to manipulate host factors that interact with parasites or pathogens. In fact, *Nosema* infection dramatically alters honey bee transcriptional responses (47–49), providing potential targets for host-based RNAi manipulation.

The Wnt signaling pathway is an important regulator of immune function in mammals (50) and has recently been found to function in regulating immune pathways, specifically Toll pathways, in insects (*Drosophila*) (51). There are several genes that serve as antagonists of the Wnt pathway, and thus, upregulated expression of these genes should suppress immune function. One of these genes has been found in *Drosophila*—the *naked cuticle* gene (52). As suppressors of immune function, these genes may serve as excellent targets for parasite manipulation of the hosts' transcriptional pathways: if the parasite can upregulate these antagonists, it can suppress the host's immune response. In light of the fact that *nkd* is a negative regulator of the Wnt signaling pathway, we hypothesized that *nkd* expression might be regulated by *Nosema* infection and thereby could serve as a potential target of RNAi to mitigate *Nosema* infection in honey bees. In the work described here, we confirmed that *nkd* mRNA levels were upregulated when bees were infected by *N. ceranae*. Our RNAi experiments showed that silencing *nkd* led to the enhancement of immune responses through an increase in immune gene expression, reduction in parasite spore load, and improvement in the life expectancy of *N. ceranae*-infected bees. We provide unequivocal evidence that silencing the *nkd* gene is an efficient way to control *N. ceranae* infection and improve honey bee health.

## MATERIALS AND METHODS

**Honey bees.** The honey bees used in this study were collected from colonies of *Apis mellifera ligustica* maintained at the USDA-ARS Bee Research Laboratory, Beltsville, MD. Newly emerged bees were obtained by remov-

ing honeycomb frames with sealed brood from strong and healthy colonies that were identified as *Nosema* negative, placing the frames into mesh-walled cages individually, and maintaining the frames in an insect growth chamber at  $34 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $55\% \pm 5\%$  relative humidity (RH) overnight. Emerging adult worker bees were collected the next day ( $<24$  h). In order to make sure that the experimental bees were free of *N. ceranae* infection before proceeding to the experimental inoculation, we confirmed the negative status of *Nosema* infection using a hemocytometer and light microscopy. Briefly, 30 abdomens of newly emerged bees were dissected and ground up thoroughly in 30 ml of deionized  $\text{H}_2\text{O}$ . Ten microliters of the homogenate was loaded onto a hemocytometer, and the presence or absence of spores was determined under a light microscope following a previously described method (53).

**Inoculum preparation.** *N. ceranae* spores were purified from foragers collected outside the entrance of identified *N. ceranae*-infected colonies. Midguts were pulled out and homogenized in sterile distilled water ( $\text{dH}_2\text{O}$ ). The purification of *Nosema* spores from the homogenate was performed as described by Fries et al. (54). The homogenate was filtered through a nylon mesh cloth (65- $\mu\text{m}$  pore size) by centrifuging it for 5 min at  $3,000 \times g$ . The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in sterile water and centrifuged for 10 min at  $5,000 \times g$ ; this step was repeated twice. Finally, the pellet was resuspended in  $\text{dH}_2\text{O}$  and stored at room temperature for no more than 1 week. The inoculum was obtained by diluting spore solution with sucrose solution, with a final concentration of  $2.0 \times 10^7$  spores/ml in 50% (mass/vol) sucrose solution.

**Inoculation.** The newly emerged bees were collected and starved for 3 h in an incubator ( $32^\circ\text{C}$  and 75% RH) before being inoculated with *Nosema* spores in solution. Individual feeding was performed for each bee by holding two wings of a bee on each side with one hand and feeding the bee with 5- $\mu\text{l}$  inoculum (100,000 spores) with a pipette with the other hand. Thirty bees were then distributed into each cup cage, which is a plastic bee-rearing cup with a top-feeder design (55). A 3-ml syringe filled with 50% (mass/vol) sucrose solution was inserted in the top of the cage to feed the bees, and the solution was changed every 3 days. A small pollen patty was supplied in the bottom of the cage for 6 days. The same number of control bees (without spore inoculation) were transferred into a cup cage as well. There were 4 replicates for each group. All cup cages were maintained in an incubator ( $32^\circ\text{C}$  and 75% RH). Five bees were sampled from each cage at days 6 (D6), 9 (D9), 12 (D12), 15 (D15), and 18 (D18) postinoculation. The collected bee samples were immediately frozen at  $-80^\circ\text{C}$  and stored until processing.

**Production of dsRNA.** Primers were designed from the sequence of the *A. mellifera nkd* gene (GenBank accession no. XM\_001120899) by using the E-RNAi web service (56), and primers for *GFP*, which served as the control gene, were used from previous studies (57). All primer sequences were fused with the T7 promoter sequence (Table 1). PCRs were performed using different templates individually: the cDNA of an adult bee was used for the amplification of *nkd*, and the pGFP vector (Clontech) was used for the amplification of *GFP*. The 100- $\mu\text{l}$  PCR mixture contained the following: 78  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 10  $\mu\text{l}$   $10\times$  reaction buffer (Invitrogen), 3  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$ , 2  $\mu\text{l}$  deoxynucleoside triphosphate (dNTP) mixture (10 mM; Invitrogen), 2  $\mu\text{l}$  forward primer (20  $\mu\text{M}$ ), 2  $\mu\text{l}$  reverse primer (20  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{l}$  *Taq* polymerase (Invitrogen), and 2  $\mu\text{l}$  DNA template. The PCR program was  $94^\circ\text{C}$  for 3 min, followed by 35 cycles of  $94^\circ\text{C}$  for 30 s,  $56^\circ\text{C}$  for 30 s, and  $72^\circ\text{C}$  for 90 s, and then  $72^\circ\text{C}$  for 10 min. After each PCR amplification, the products were verified in 1.0% agarose gels, purified, and used as the templates for the *in vitro* transcription reaction. The production of dsRNAs was carried out by using the MEGAscript RNAi kit (Ambion). The transcription reaction mixtures were assembled according to the manufacturer's instruction, and the time of incubation at  $37^\circ\text{C}$  was extended to 15 h. The following steps, such as nuclease digestion, purification, and elution, were performed using the materials associated with the kit. The quality of the dsRNAs was tested using 1.0% agarose gels, and their concentrations were determined with a NanoDrop 8000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc.). The products were diluted

TABLE 1 Primer sequences used in this study

| Purpose | Gene              | Accession no.                | Primer       | Sequence (5'→3') <sup>a</sup>                        | Amplicon  |             |  | Reference or source |
|---------|-------------------|------------------------------|--------------|--|-----------|-------------|--|---------------------|
|         |                   |                              |              |  | Location  | Length (bp) |  |                     |
| RNAi    | <i>nkd</i>        | <a href="#">XM_001120899</a> | nkd-RNAi-F   | <u>TAATACGACTCACTATAGGGCG</u> ACGCGCTTATGTTCAACCTC   | 1889–2122 | 234         |  | This study          |
|         |                   |                              | nkd-RNAi-R   | TAATACGACTCACTATAGGGCGAGGTCGCGTGTTCAAATGAT           |           |             |  |                     |
|         | <i>GFP</i>        | <a href="#">AF324407</a>     | GFP-RNAi-F   | <u>TAATACGACTCACTATAGGGCG</u> ATTCCATGGCCAACACTTGTCA | 173–674   | 502         |  | <a href="#">57</a>  |
|         |                   |                              | GFP-RNAi-R   | TAATACGACTCACTATAGGGCGATCAAGAAGGACCATGTGGTC          |           |             |  |                     |
| qPCR    | <i>nkd</i>        |                              | nkd-F        | AGGATGACGGTGAAAATGCG                                 | 1365–1540 | 176         |  | This study          |
|         |                   |                              | nkd-R        | ATTAGTCGTGAGGAGAGGCG                                 |           |             |  |                     |
|         | $\beta$ -actin    | <a href="#">NM_001185145</a> | actin-F      | TGCCAACACTGTCCTTTCTG                                 | 1018–1173 | 156         |  | <a href="#">73</a>  |
|         |                   |                              | actin-R      | AGAATTGACCCACCAATCCA                                 |           |             |  |                     |
|         | <i>Abaecin</i>    | <a href="#">NM_001011617</a> | Abaecin-F    | AGATCTGCACACTCGAGGTCTG                               | 14–214    | 201         |  | <a href="#">74</a>  |
|         |                   |                              | Abaecin-R    | TCGGATTGAATGGTCCCTGA                                 |           |             |  |                     |
|         | <i>Apidaecin</i>  | <a href="#">NM_001011613</a> | Apidaecin-F  | TTTGCCTTAGCAATTCTTGTTG                               | 58–137    | 80          |  | This study          |
|         |                   |                              | Apidaecin-R  | GCAGGTCGAGTAGGCGGATCT                                |           |             |  |                     |
|         | <i>Defensin-1</i> | <a href="#">NM_001011616</a> | Defensin-1-F | TGTCGGCCTTCTCTTCATGG                                 | 88–288    | 201         |  | This study          |
|         |                   |                              | Defensin-1-R | TGACCTCCAGCTTTACCCAAA                                |           |             |  |                     |
|         | <i>PGRP-S2</i>    | <a href="#">NM_001163716</a> | PGRP-S2-F    | TTGCACAAAATCCTCCGCC                                  | 146–274   | 129         |  | This study          |
|         |                   |                              | PGRP-S2-R    | CACCCCAACCCTTCTCATCT                                 |           |             |  |                     |

<sup>a</sup> Underlining shows the T7 promoter sequence.

with sucrose solution to final concentrations of 10  $\mu$ g/ml, 20  $\mu$ g/ml, and 40  $\mu$ g/ml dsRNA in 50% (mass/vol) sucrose solution. The final solutions were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

**RNAi treatment.** Before the RNA interference (RNAi) treatment, the newly emerged bees were collected, inoculated with *N. ceranae* spores as described above, and then transferred into bee-rearing cages. In each cage, 20 bees were supplied with 1.5 ml of 50% sucrose solution containing *nkd* or *GFP* dsRNA in a 3-ml syringe and a small pollen patty in the bottom of the cage on the same day. Bees were fed with the dsRNA for 15 days; the dsRNA solution was changed daily. Pollen patties were supplied for the first 6 days and changed every 3 days. All cages were incubated at  $32^{\circ}\text{C}$  and 75% RH, and dead bees were removed every day.

To test the efficiency of gene knockdown, three different concentrations of *nkd* dsRNA solution, 10  $\mu$ g/ml, 20  $\mu$ g/ml, and 40  $\mu$ g/ml, were applied to separate cages, and 20  $\mu$ g/ml *GFP* dsRNA solution was used for control bees. There were three replicates for each treatment. The bees were sampled at D9 and D15 after the ingestion of dsRNA and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

To study the biological responses to the knockdown of *nkd*, 20  $\mu$ g/ml of *nkd* dsRNA and *GFP* dsRNA were fed to infected bees. Another control group was set up with bees that were not given any treatment and fed only 50% sucrose solution and pollen. Each group contained three replicates. The numbers of dead bees were recorded daily, and dead bees were then removed. All the bees were collected at D15 and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

**Spore counting.** To evaluate the *Nosema* infection levels in the RNAi-treated bees, the spores were counted in individual bees. First, the abdomens were separated, put into 1.5-ml Eppendorf tubes individually, and homogenized thoroughly in 1 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  using a pestle. Then, each homogenate was diluted 100 times. Ten microliters of the diluted solution was loaded onto a hemocytometer, and spores were counted under a light microscope as described by Cantwell (53).

**RNA extraction and cDNA synthesis.** TRIzol reagent (Invitrogen) was used to extract total RNA from the abdomens of individual bees, following the manufacturer's protocols. Any genomic DNA contamination was removed by treatment with DNase I (DNA-free kit; Ambion). The purity and quantity of RNA samples were examined by using a NanoDrop 8000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc.). All RNAs were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. First-strand cDNA was produced from a 20- $\mu$ l reverse transcription reaction mixture that contained 2  $\mu$ l total RNA (approximately 1  $\mu$ g/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l dNTP mixture (10 mM), 1  $\mu$ l random primers (0.15  $\mu$ g/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l dithiothreitol (DTT) (0.1 M), 4  $\mu$ l 5 $\times$  first-

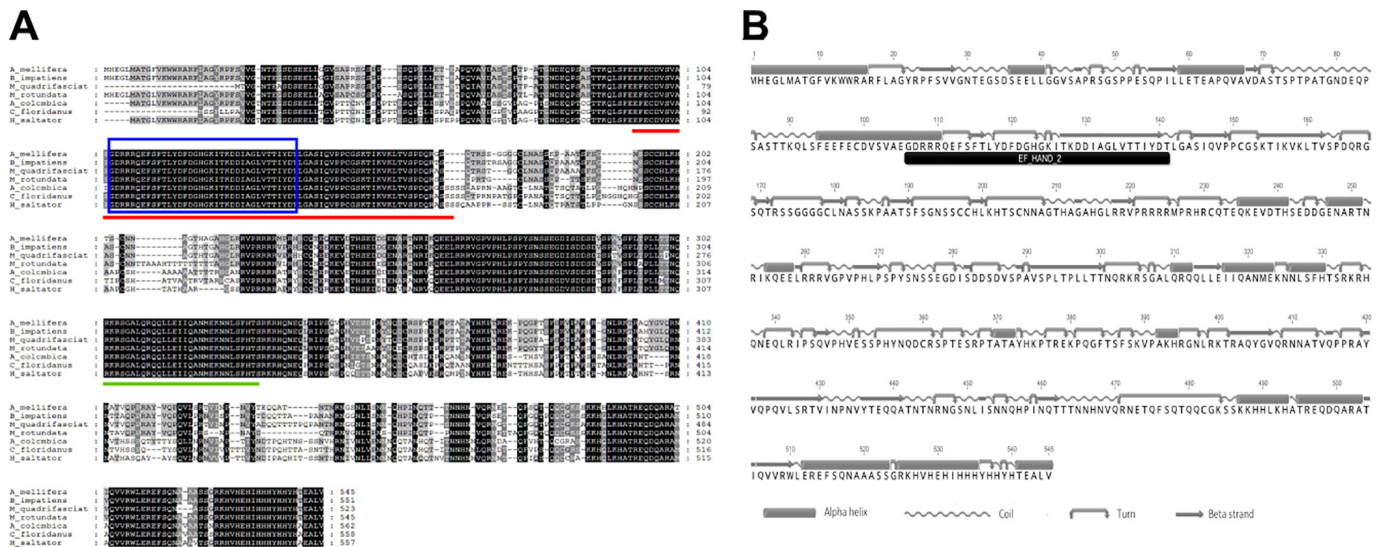
strand buffer, 1  $\mu$ l SuperScript III reverse transcriptase (200 U/ $\mu$ l, Invitrogen), and 10  $\mu$ l nuclease-free water. The reaction program was as follows:  $25^{\circ}\text{C}$  for 5 min and  $50^{\circ}\text{C}$  for 45 min, followed by  $70^{\circ}\text{C}$  for 15 min. The cDNAs were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

**qPCR.** Quantitative PCRs (qPCRs) were run on a CFX384 Touch real-time PCR system (Bio-Rad, Hercules, CA), and SYBR green was selected as the detection signal. The primers used here were designed with Primer3 (Table 1) (58).  $\beta$ -actin served as the reference gene, and all primer pairs were validated as described in reference 59. Each 10- $\mu$ l PCR mixture was assembled by mixing 5  $\mu$ l 2 $\times$  Brilliant III ultrafast SYBR green qPCR mix (Stratagene, La Jolla, CA), 0.25  $\mu$ l forward primer (20 mM), 0.25  $\mu$ l reverse primer (20 mM), 0.5  $\mu$ l cDNA, and 4  $\mu$ l nuclease-free water. Each reaction was run in duplicate. The PCR program was  $95^{\circ}\text{C}$  for 3 min, followed by 40 cycles of  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 s and  $60^{\circ}\text{C}$  for 45 s. Melting curves and no-template-control (NTC) reactions were monitored to evaluate the quality and specificity of amplification. Only a single peak was seen in all melting curves, and no peaks showed for the NTCs. The PCR products were run on a 1% agarose gel to confirm the expected amplification sizes. The threshold cycle ( $C_T$ ) values were generated by using CFX Manager 3.1 (Bio-Rad). The relative quantification of gene expression was calculated with the comparative  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ) method (60). For each gene, the average  $C_T$  value of the target was normalized with the corresponding  $\beta$ -actin value using the formula  $\Delta C_T = \text{average } C_{T(\text{target})} - \text{average } C_{T(\beta\text{-actin})}$ , and the group of bees with the lowest level of gene expression was chosen as a calibrator [ $\Delta C_{T(\text{calibrator})}$ ]. The  $\Delta C_T$  value of each group was subtracted from the  $\Delta C_{T(\text{calibrator})}$  value to generate the  $\Delta\Delta C_T$ . The concentration of each target in each group was calculated using the formula  $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$  and expressed as the  $n$ -fold difference relative to the calibrator value.

**Bioinformatic and statistical analyses.** Multiple alignments of insect *nkd* protein sequences were carried out with ClustalX 2.0 (61). Protein domain identification and secondary structure prediction of *A. mellifera nkd* were performed with the InterProScan tool and EMBOS: Garnier algorithm of Geneious version 9.1.3 (Biomatters), respectively.

The dynamics of *nkd* gene expression during the course of *Nosema* infection, the levels of immune gene expression, and the spore loads of infected bees after RNAi treatment were analyzed using independent-sample  $t$  tests. The mRNA levels of *nkd* after dsRNA treatment were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) with all compared groups passing an equal variance test, and the *post hoc* effects were determined using the Tukey honestly significant difference (HSD) test. Survival anal-





**FIG 1** Sequence conservation and predicted secondary structure of *A. mellifera* *nkd*-encoded protein. (A) Multiple alignment of *A. mellifera* (XP\_001120899), *Bombus impatiens* (XP\_012249347), *Megachile rotundata* (XP\_003702467), *Melipona quadrifasciata* (KOX70301), *Atta colombica* (KYM87061), *Harpegnathos saltator* (XP\_011151892), and *Camponotus floridanus* (EFN66676) *nkd* protein sequences. Black and gray shadings indicate identity and a high degree of conservation of amino acids, respectively. The region responsible for interaction with *dsh* is indicated by the red bar. The nuclear localization motif is underlined by the green bar. The blue box highlights the EF-hand domain. (B) Protein domain identification and secondary structure prediction of *A. mellifera* *nkd*. The conserved domain is shown by a black bar.

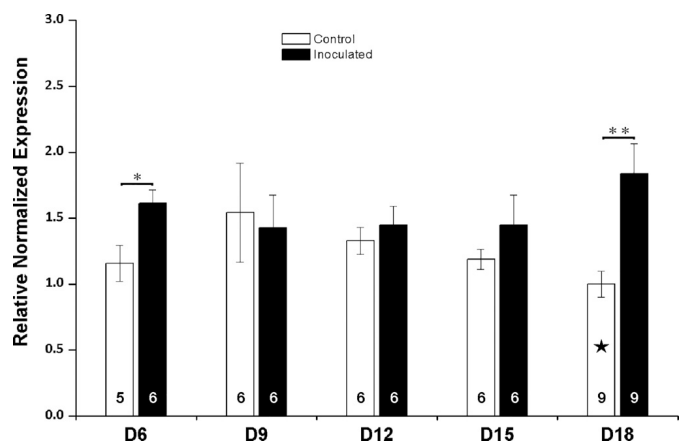
ysis was performed using the Kaplan-Meier method, and log rank and Wilcoxon tests were computed to assess the overall homogeneity between the treatment strata. Pairwise comparisons were carried out using Wilcoxon tests. In all cases, a *P* value of <0.05 was taken to be significant. All analyses were carried out using PASW Statistics 18 (SPSS, Inc.).

## RESULTS

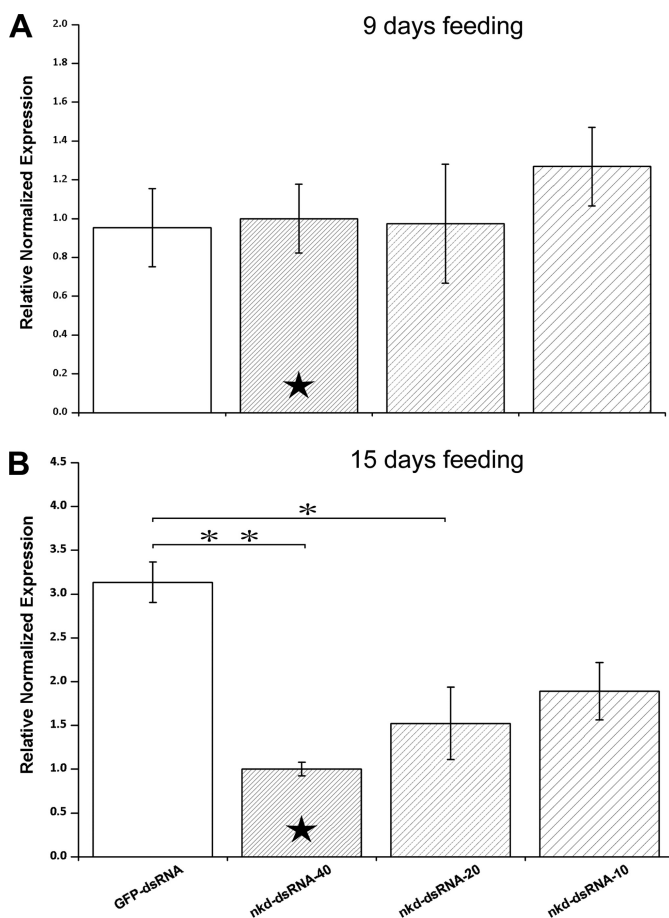
**Identification of a highly conserved *nkd* gene in honey bees.** The identified honey bee *nkd* gene encodes a predicted protein of 545 amino acids (aa), which shares 92.9% and 89.2% sequence identity with the *nkd*-encoded proteins of the bumble bee *Bombus impatiens* and stingless bee *Melipona quadrifasciata*, respectively (Fig. 1). This protein is highly conserved in Hymenoptera, as remarkable sequence identity is also seen in non-Apidae species, ranging from 65.5% (*Camponotus floridanus*) to 85.8% (*Megachile rotundata*) (Fig. 1). A conserved EF-hand domain (InterPro accession number IPR002048), which is known to bind calcium, was identified in the *nkd* proteins (Fig. 1). Additional conserved regions included a region responsible for interaction with *Dishevelled* (*Dsh*), a component of the Wnt signaling pathway (62), and the nuclear localization motif that is required for nuclear localization and inhibition of Wnt signaling (Fig. 1) (63). Although the diversity of *nkd* protein sequences increases dramatically when the comparison is expanded to different insect orders, the sequence features mentioned above are still highly conserved (see Fig. S1 in the supplemental material).

***N. ceranae* infection upregulates the expression of the *nkd* gene.** As shown by the results in Fig. 2, the dynamics of *nkd* gene expression was altered during the *N. ceranae* infection. The expression of *nkd* in the infected bees was significantly upregulated compared with that of control bees at day 6 (D6) and D18 postinoculation (for D6, *t* test, *t* = -2.774, *df* = 9, *P* = 0.022; and for D18, *t* test, *t* = -3.387, *df* = 10.860, *P* = 0.006) (Fig. 2). Collectively, *N. ceranae* infection upregulated the *nkd* gene expression (*t* test, *t* = -2.872, *df* = 63, *P* = 0.006).

**Ingestion of dsRNA silences the *nkd* gene expression in *N. ceranae*-infected bees.** As shown by the results in Fig. 3, 9 days of feeding *nkd* dsRNA was insufficient to reduce the mRNA levels of the target gene in adult bees (ANOVA,  $F_{1,11} = 0.442$ , *P* = 0.742), but the gene expression could be significantly silenced by 15 days of ingesting the corresponding dsRNA (ANOVA,  $F_{1,11} = 9.1781$ , *P* = 0.005). Moreover, the knockdown of *nkd* was dosage dependent (Fig. 3): along with an increase in the dsRNA concentration, the effect of gene silencing increased. When 10 µg/ml of dsRNA was applied, a 40% knockdown of *nkd* mRNA was achieved, while larger amounts of 20 or 40 µg/ml dsRNA resulted in 50% and 70%



**FIG 2** Expression profile of *nkd* during *N. ceranae* infection. The x axis indicates the days postinoculation with *Nosema* spores. The relative gene expression levels (y axis) are shown as mean values  $\pm$  standard errors of the means (SEM). The sample size is shown in the bottom of each bar, and the solid five-pointed star indicates the calibrator used to normalize the gene expression. Data were analyzed by the independent-sample *t* test. Significant differences between groups are indicated by asterisks (\*, *P* < 0.05; \*\*, *P* < 0.01).

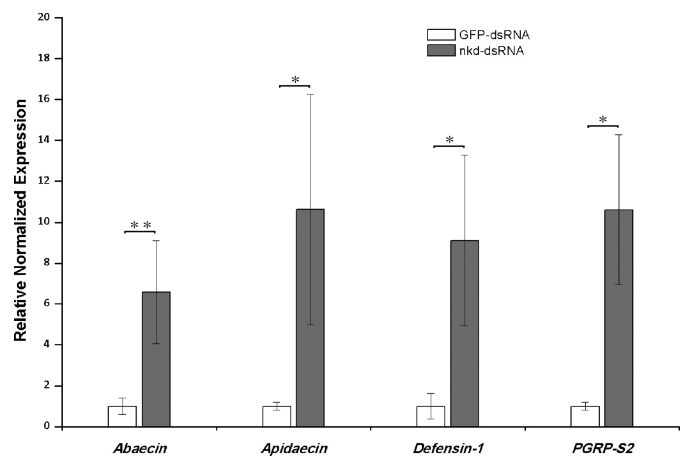


**FIG 3** Knockdown of *nkd* gene in adult bees by dsRNA ingestion. All groups of adult bees were inoculated with *Nosema* spores first and then fed with sucrose solution containing dsRNA for 15 days. The silencing effect was examined after 9 days (A) and 15 days (B) of feeding dsRNA. The control bees (GFP-dsRNA) were fed with the dsRNA derived from the *GFP* sequence. For the treatment groups, three different concentrations of *nkd* dsRNA were examined, as follows: 40 µg/ml (nkd-dsRNA-40), 20 µg/ml (nkd-dsRNA-20), and 10 µg/ml (nkd-dsRNA-10). The relative gene expression levels are shown as mean values  $\pm$  SEM. All groups had the same sample size ( $n = 3$ ). The calibrator used to normalize the gene expression is indicated by a solid five-pointed star inside the bar. One-way ANOVA was employed to analyze the differences between data, and *post hoc* effects were identified by Tukey HSD tests. Significant differences between groups are indicated by asterisks (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ).

gene silencing, and the differences compared to the *nkd* expression in controls became significant ( $P = 0.018$  for 20 µg/ml and  $P = 0.004$  for 40 µg/ml) (Fig. 3).

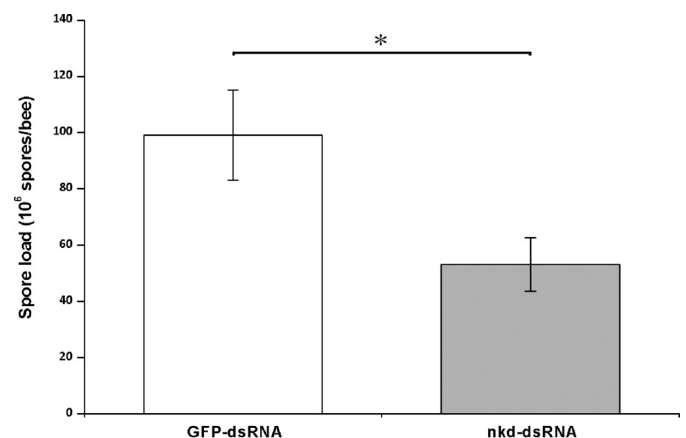
**Silencing of the *nkd* gene upregulates immune gene expression in *N. ceranae*-infected bees.** As shown by the results in Fig. 4, the *nkd*-silenced bees expressed significantly larger amounts of mRNA for three antimicrobial peptide (AMP) genes, *Abaecin*, *Apidaecin*, and *Defensin-1*, relative to the expression of these genes in the control bees (for *Abaecin*, *t* test,  $t = -3.689$ ,  $df = 9$ ,  $P = 0.005$ ; for *Apidaecin*, *t* test,  $t = -3.047$ ,  $df = 4.982$ ,  $P = 0.029$ ; and for *Defensin-1*, *t* test,  $t = -2.855$ ,  $df = 9$ ,  $P = 0.019$ ). Moreover, the expression of a peptidoglycan recognition protein (PGRP) gene, *PGRP-S2*, was also significantly upregulated in *nkd*-silenced bees compared with its expression in the control bees (*t* test,  $t = -3.183$ ,  $df = 5.043$ ,  $P = 0.024$ ) (Fig. 4).

**Silencing of *nkd* gene reduces *Nosema* spore levels and extends the life span of *N. ceranae*-infected bees.** After feeding with



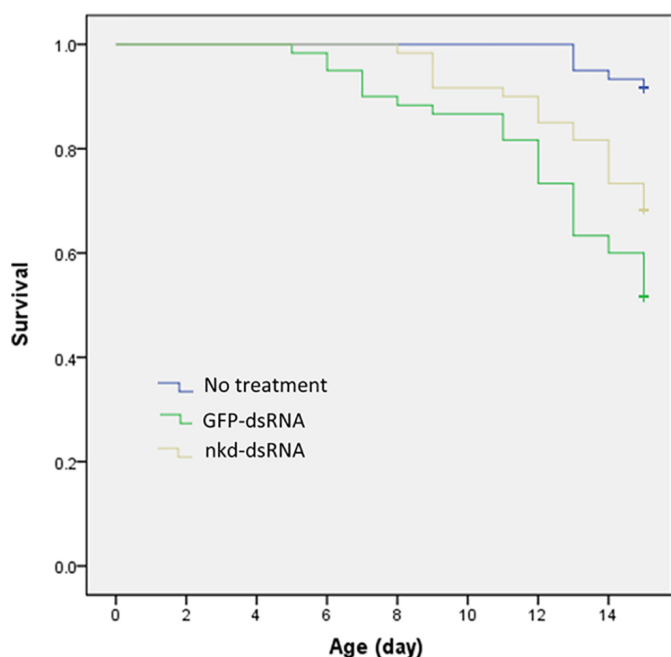
**FIG 4** Effects of *nkd* gene silencing on immune gene expression in *Nosema*-infected bees. The relative mRNA levels of immune genes (x axis) were compared between control bees fed with 20 µg/ml *GFP* dsRNA (GFP-dsRNA;  $n = 6$ ) and treatment bees fed with 20 µg/ml *nkd* dsRNA (nkd-dsRNA;  $n = 5$ ). Both groups were inoculated with *Nosema* spores before dsRNA feeding. The expression levels are shown as mean values  $\pm$  SEM. Data were analyzed by independent-sample *t* test. Significant differences between groups are indicated by asterisks (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ).

*nkd* dsRNA, the spore load of infected bees was significantly (approximately 50%) lower than that in controls (fed with *GFP* dsRNA) (*t* test,  $t = 2.458$ ,  $df = 15.485$ ,  $P = 0.026$ ) (Fig. 5), indicating that knockdown of *nkd* gene expression results in a decrease in *Nosema* infection levels. Survival analysis was performed to further examine the effect of silencing the *nkd* gene on the life span of honey bees after *Nosema* infection. The survival distributions for the groups tested were significantly different (log rank test,  $\chi^2 = 24.472$ ,  $df = 2$ ,  $P < 0.001$ ; and Wilcoxon test,  $\chi^2 = 25.020$ ,  $df = 2$ ,  $P < 0.001$ ) (Fig. 6). *Nosema* infection indeed induced higher mortality in the infected honey bees (no treatment versus *GFP* dsRNA treatment, Wilcoxon test,  $\chi^2 = 25.218$ ,  $P < 0.001$ ) (Fig. 6); however, silencing of *nkd* significantly reduced the inci-



**FIG 5** Effect of *nkd* gene silencing on *Nosema* infection levels in adult bees. The *Nosema* infection levels were determined by spore counting. The spore loads of the two groups of bees, the control bees fed with 20 µg/ml *GFP* dsRNA ( $n = 11$ ) and the treatment bees fed with 20 µg/ml *nkd* dsRNA ( $n = 8$ ), were compared. The spore loads are expressed as mean values  $\pm$  SEM. Significant difference between data was analyzed by independent-sample *t* test and is indicated with an asterisk (\*,  $P < 0.05$ ).





**FIG 6** Effect of *nkd* gene silencing on the life span of honey bees infected by *N. ceranae*. Survival curves for bees inoculated with 100,000 *N. ceranae* spores at day 0 (i.e., within 24 h after adult emergence) and fed with 50% (mass/vol) sucrose solution containing 20  $\mu$ g/ml *nkd* dsRNA (nkd-dsRNA;  $n = 60$ ) or 20  $\mu$ g/ml GFP dsRNA (GFP-dsRNA;  $n = 60$ ) for 15 days and for the bees that did not receive any treatment and were only fed with 50% sucrose solution (no treatment;  $n = 60$ ). Knockdown of *nkd* gene reduced the incidence of death ( $P = 0.041$  by Wilcoxon test).

dence of death of adult bees (Fig. 6) (*nkd* dsRNA versus GFP dsRNA, Wilcoxon test,  $\chi^2 = 4.165$ ,  $P = 0.041$ ).

## DISCUSSION

Significant progress has been made in exploring RNAi as a therapeutic strategy for controlling diseases in honey bees, with much attention focused on pathogen-specific virulence determinants. *Nosema* are obligate intracellular parasites and, therefore, require host cell proteins and pathways to support their replication and many phases of their life cycles (12, 13). In the present study, the identification and characterization of a host-based factor that is required for parasite pathogenesis in hosts allow us to obtain important insights into the host-parasite interactions and to propose a potential drug target against the parasite.

Wnt signaling is an evolutionarily conserved pathway that plays a critical role in embryogenesis and cell proliferation and differentiation (64). Additionally, recent studies found that activation of the Wnt signaling pathway regulates the immune response to certain pathogenic bacterial infections by upregulating the expression of anti-inflammatory factors and downregulating the expression of inflammatory factors (65–68). *nkd* is linked to Wnt signaling and was originally found to act as an inducible antagonist of Wnt signaling during embryonic development in *Drosophila* (52). The results of our study confirmed our hypothesis that *nkd* and Wnt signaling might be also involved in the honey bee responses to *Nosema* infections. Indeed, *Nosema* infection can result in dramatic host transcriptional responses (47–49), and the expression of the *nkd* gene is significantly upregulated during *N. ceranae* infection in honey bees, suggesting that *nkd* and Wnt sig-

naling might be targeted by *N. ceranae* during the infection process to alter the defensive function of hosts.

Knockdown of *nkd* by feeding *Nosema*-infected bees with dsRNA specific to *nkd* led to several remarkable alternations, one of which was the modulation of host immune responses. Previous studies have revealed that *N. ceranae* infection induces immunosuppression in honey bees by downregulating several immune genes, such as the AMP genes *Apidaecin*, *Abaecin*, *Defensin-1*, and *Hymenoptaecin* (69, 70). Our results show that silencing the *nkd* gene in bees infected with *N. ceranae* can reverse immune suppression and enhance the host immune response. The exact mechanism of host immune induction by *nkd* silencing remains unclear. However, silencing of the *nkd* gene ultimately reduces the *Nosema* infection levels and extends the life span of infected adult bees.

Since infection always involves interaction between host and parasite/pathogen, infections can theoretically be controlled by targeting the host of the parasite/pathogen. All previous gene-based efforts to control honey bee parasites or pathogens have targeted these biotic threats directly. Here, by targeting the honey bee *nkd* gene with RNAi, we demonstrate that silencing a honey bee gene can suppress the reproduction of parasites/pathogens and improve the overall health of honey bees. Our results provide a novel host-derived strategy to mitigate honey bee disease. Similar studies have been reported in various species. For example, silencing of the *Cactus* gene, an inhibitor of the Toll pathway, reduces the extent of dengue virus infection in the midgut by fourfold in *Aedes aegypti* mosquitoes (71). Downregulation of *scavenger receptor class B type 1* (*SR-B1*) expression by RNAi dramatically decreases the susceptibility of human hepatoma cells to hepatitis C virus (HCV) infection, resulting in the inhibition of this virus infection (72). These studies together indicate that targeting host factors by RNAi can potentially protect the hosts from infections of parasites/pathogens and promote the overall health of hosts.

RNAi technology has great potential for relieving the impacts of honey bee diseases. Other previous studies (46), combined with our efforts, demonstrate that silencing parasite/host genes by RNAi manipulation is efficient to suppress parasite development and improve honey bee health to some extent in the laboratory. It is likely that the combination of both strategies, meaning targeting both host and parasite genes in the same RNAi manipulation, will lead to better results for controlling *Nosema* infection. As for field application, more experiments are needed to determine the ideal treatment time, the suitable concentration of dsRNA, and other factors. The present study will help direct the application of RNAi to mitigate *N. ceranae* infection in honey bees.

In sum, these studies have identified a host factor required for *Nosema* infection and highlight the potency of host-derived RNAi-based therapeutics to inhibit not only microsporidian parasite infection but also potentially a wide range of pathogens and parasites that cause serious diseases in honey bees.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Bart Smith, Sam Abban, and Andy Ulsamer for their laboratory and field assistance. We also thank the anonymous reviewers for their helpful comments.

Support for this study was provided by USDA-NIFA (grant 2014-67013-21784 to Y.P.C.), and C.R.-G. was supported by a Ph.D. INIA-FEDER Spanish grant (INIA-FEDER project RTA2012-00072-C02-01).

## FUNDING INFORMATION

This work, including the efforts of Yan Ping Chen, Jay D. Evans, Christina M. Grozinger, and Thomas C. Webster, was funded by USDA-NIFA (2014-67013-21784). This work, including the efforts of Cristina Rodríguez-García, was funded by INIA-FEDER (RTA2012-00072-C02-01).

## REFERENCES

- vanEngelsdorp D, Meixner MD. 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J Invertebr Pathol* 103(Suppl):S80–S95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.011>.
- Breeze TD, Vaissière BE, Bommarco R, Petanidou T, Seraphides N, Kozák L, Scheper J, Biesmeijer JC, Kleijn D, Gylstenkærne S, Moretti M, Holzschuh A, Steffan-Dewenter I, Stout JC, Pärtel M, Zobel M, Potts SG. 2014. Agricultural policies exacerbate honeybee pollination service supply-demand mismatches across Europe. *PLoS One* 9:e82996. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0082996>.
- vanEngelsdorp D, Hayes J, Underwood RM, Pettis JS. 2010. A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. *J Apic Res* 49:7–14. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.03>.
- vanEngelsdorp D, Hayes J, Underwood RM, Caron D, Pettis J. 2011. A survey of managed honey bee colony losses in the USA, fall 2009 to winter 2010. *J Apic Res* 50:1–10. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.50.1.01>.
- vanEngelsdorp D, Caron D, Hayes J, Underwood R, Henson M, Rennich K, Spleen A, Andree M, Snyder R, Lee K, Roccasecca K, Wilson M, Wilkes J, Lengerich E, Pettis J. 2012. A national survey of managed honey bee 2010–11 winter colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership. *J Apic Res* 51:115–124. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.51.1.14>.
- Spleen AM, Lengerich EJ, Rennich K, Caron D, Rose R, Pettis JS, Henson M, Wilkes JT, Wilson M, Stitzinger J, Lee K, Andree M, Snyder R, vanEngelsdorp D. 2013. A national survey of managed honey bee 2011–12 winter colony losses in the United States: results from the Bee Informed Partnership. *J Apic Res* 52:44–53. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.2.07>.
- Steinhauer NA, Rennich K, Wilson ME, Caron DM, Lengerich EJ, Pettis JS, Rose R, Skinner JA, Tarpy DR, Wilkes JT, vanEngelsdorp D. 2014. A national survey of managed honey bee 2012–2013 annual colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership. *J Apic Res* 53:1–18. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.53.1.01>.
- van Engelsdorp D, Hayes J, Jr, Underwood RM, Pettis J. 2008. A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. *PLoS One* 3:e4071. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0004071>.
- vanEngelsdorp D, Underwood R, Caron D, Hayes JJ. 2007. An estimate of managed colony losses in the winter of 2006–2007: a report commissioned by the Apiary Inspectors of America. *Am Bee J* 147:599–603.
- Genersch E. 2010. Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:87–97. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2573-8>.
- Ratnieks FLW, Carreck NL. 2010. Clarity on honey bee collapse? *Science* 327:152–153. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1185563>.
- Fries I. 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol* 103(Suppl):S73–S79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.017>.
- Holt HL, Grozinger CM. 2016. Approaches and challenges to managing *Nosema* (Microsporida: Nosematidae) parasites in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *J Econ Entomol* 109:1487–1503. <http://dx.doi.org/10.1093/jeet/tow103>.
- Fries I, Feng F, da Silva A, Slemenda SB, Pieniazek NJ. 1996. *Nosema ceranae* n. sp. (Microsporida, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *Eur J Protistol* 32:356–365. [http://dx.doi.org/10.1016/S0932-4739\(96\)80059-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0932-4739(96)80059-9).
- Higes M, Martín R, Meana A. 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J Invertebr Pathol* 92:93–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2006.02.005>.
- Huang W-F, Jiang J-H, Chen Y-W, Wang C-H. 2007. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie* 38:30–37. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2006054>.
- Chen Y, Evans JD, Smith IB, Pettis JS. 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *J Invertebr Pathol* 97:186–188. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2007.07.010>.
- Giersch T, Berg T, Galea F, Hornitzky M. 2009. *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie* 40:117–123. <http://dx.doi.org/10.1051/apido/2008065>.
- Higes M, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, Botías C, Meana A. 2009. The presence of *Nosema ceranae* (Microsporida) in North African honey bees (*Apis mellifera intermissa*). *J Apic Res* 48:217–219. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.48.3.12>.
- Invernizzi C, Abud C, Tomasco IH, Harriet J, Ramallo G, Campá J, Katz H, Gardiol G, Mendoza Y. 2009. Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *J Invertebr Pathol* 101:150–153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.03.006>.
- Martín-Hernández R, Meana A, Prieto L, Salvador AM, Garrido-Bailón E, Higes M. 2007. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl Environ Microbiol* 73:6331–6338. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00270-07>.
- Williams GR, Shafer ABA, Rogers REL, Shutler D, Stewart DT. 2008. First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA. *J Invertebr Pathol* 97:189–192. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2007.08.005>.
- Traver BE, Fell RD. 2011. Prevalence and infection intensity of *Nosema* in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Virginia. *J Invertebr Pathol* 107:43–49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2011.02.003>.
- Yoshiyama M, Kimura K. 2011. Distribution of *Nosema ceranae* in the European honeybee, *Apis mellifera* in Japan. *J Invertebr Pathol* 106:263–267. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2010.10.010>.
- Martínez J, Leal G, Conget P. 2012. *Nosema ceranae* an emergent pathogen of *Apis mellifera* in Chile. *Parasitol Res* 111:601–607. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-012-2875-0>.
- Goblirsch M, Huang ZY, Spivak M. 2013. Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. *PLoS One* 8:e58165. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0058165>.
- Higes M, García-Palencia P, Martín-Hernández R, Meana A. 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporida). *J Invertebr Pathol* 94:211–217. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2006.11.001>.
- Mayack C, Naug D. 2009. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *J Invertebr Pathol* 100:185–188. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2008.12.001>.
- Paxton RJ, Klee J, Korpela S, Fries I. 2007. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* 38:558–565. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2007037>.
- Higes M, Martín-Hernández R, Botías C, Bailón EG, González-Porto AV, Barrios L, del Nozal MJ, Bernal JL, Jiménez JJ, Palencia PG, Meana A. 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ Microbiol* 10:2659–2669. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x>.
- Higes M, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, González-Porto AV, García-Palencia P, Meana A, Del Nozal MJ, Mayo R, Bernal JL. 2009. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environ Microbiol Rep* 1:110–113. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00014.x>.
- Alaux C, Brunet J-L, Dussaubat C, Mondet F, Tchamitchan S, Cousin M, Brillard J, Baldy A, Belzunces LP, Le Conte Y. 2010. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ Microbiol* 12:774–782. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02123.x>.
- Pettis J, vanEngelsdorp D, Johnson J, Dively G. 2012. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* 99:153–158. <http://dx.doi.org/10.1007/s00114-011-0881-1>.
- Vidau C, Diogon M, Aufaure J, Fontbonne R, Viguès B, Brunet J-L, Texier C, Biron DG, Blot N, El Alaoui H, Belzunces LP, Delbac F. 2011. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS One* 6:e21550. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0021550>.
- Wu JY, Smart MD, Anelli CM, Sheppard WS. 2012. Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporida) infection.

- J Invertebr Pathol 109:326–329. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2012.01.005>.
36. Huang W-F, Solter LF, Yau PM, Imai BS. 2013. *Nosema ceranae* escapes fumagillin control in honey bees. PLoS Path 9:e1003185. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003185>.
  37. Hannon GJ. 2002. RNA interference. Nature 418:244–251. <http://dx.doi.org/10.1038/418244a>.
  38. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391:806–811. <http://dx.doi.org/10.1038/35888>.
  39. Grozinger CM, Robinson GE. 2015. The power and promise of applying genomics to honey bee health. Curr Opin Insect Sci 10:124–132. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2015.03.007>.
  40. Liu X, Zhang Y, Yan X, Han R. 2010. Prevention of Chinese sacbrood virus infection in *Apis cerana* using RNA interference. Curr Microbiol 61:422–428. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-010-9633-2>.
  41. Chen YP, Pettis JS, Corona M, Chen WP, Li CJ, Spivak M, Visscher PK, DeGrandi-Hoffman G, Boncristiani H, Zhao Y, vanEngelsdorp D, Delaplane K, Solter L, Drummond F, Kramer M, Lipkin WI, Palacios G, Hamilton MC, Smith B, Huang SK, Zheng HQ, Li JL, Zhang X, Zhou AF, Wu LY, Zhou JZ, Lee M-L, Teixeira EW, Li ZG, Evans JD. 2014. Israeli acute paralysis virus: epidemiology, pathogenesis and implications for honey bee health. PLoS Pathog 10:e1004261. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004261>.
  42. Desai SD, Eu YJ, Whyard S, Currie RW. 2012. Reduction in deformed wing virus infection in larval and adult honey bees (*Apis mellifera* L.) by double-stranded RNA ingestion. Insect Mol Biol 21:446–455. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2583.2012.01150.x>.
  43. Maori E, Paldi N, Shafir S, Kalev H, Tsur E, Glick E, Sela I. 2009. IAPV, a bee-affecting virus associated with Colony Collapse Disorder can be silenced by dsRNA ingestion. Insect Mol Biol 18:55–60. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00847.x>.
  44. Hunter W, Ellis J, vanEngelsdorp D, Hayes J, Westervelt D, Glick E, Williams M, Sela I, Maori E, Pettis J, Cox-Foster D, Paldi N. 2010. Large-scale field application of RNAi technology reducing Israeli acute paralysis virus disease in honey bees (*Apis mellifera*, Hymenoptera: Apidae). PLoS Pathog 6:e1001160. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001160>.
  45. Garbani Y, Maori E, Kalev H, Shafir S, Sela I. 2012. Bidirectional transfer of RNAi between honey bee and *Varroa destructor*: *Varroa* gene silencing reduces *Varroa* population. PLoS Pathog 8:e1003035. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003035>.
  46. Paldi N, Glick E, Oliva M, Zilberberg Y, Aubin L, Pettis J, Chen Y, Evans JD. 2010. Effective gene silencing in a microsporidian parasite associated with honeybee (*Apis mellifera*) colony declines. Appl Environ Microbiol 76:5960–5964. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01067-10>.
  47. Aufaure J, Misme-Aucouturier B, Vigues B, Texier C, Delbac F, Blot N. 2014. Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides. PLoS One 9:e91686. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0091686>.
  48. Dussaubat C, Brunet J-L, Higes M, Colbourne JK, Lopez J, Choi J-H, Martín-Hernández R, Botías C, Cousin M, McDonnell C, Bonnet M, Belzunces LP, Moritz RFA, Le Conte Y, Alaux C. 2012. Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. PLoS One 7:e37017. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0037017>.
  49. Holt H, Aronstein K, Grozinger C. 2013. Chronic parasitization by *Nosema* microsporidia causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honey bee workers (*Apis mellifera*). BMC Genomics 14:799. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-14-799>.
  50. Staal FJT, Luis TC, Tiemessen MM. 2008. WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. Nat Rev Immunol 8:581–593. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2360>.
  51. Gordon MD, Dionne MS, Schneider DS, Nusse R. 2005. WntD is a feedback inhibitor of Dorsal/NF- $\kappa$ B in *Drosophila* development and immunity. Nature 437:746–749. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04073>.
  52. Zeng W, Wharton KA, Mack JA, Wang K, Gadbaw M, Suyama K, Klein PS, Scott MP. 2000. *naked cuticle* encodes an inducible antagonist of Wnt signalling. Nature 403:789–795. <http://dx.doi.org/10.1038/35001615>.
  53. Cantwell GE. 1970. Standard methods for counting *Nosema* spores. Am Bee J 110:222–223.
  54. Fries I, Chauzat MP, Chen YP, Doublet V, Genersch E, Gisder S, Higes M, McMahon DP, Martín-Hernández R, Natsopoulou M, Paxton RJ, Tanner G, Webster TC, Williams GR. 2013. Standard methods for *Nosema* research. J Apic Res 52:1–28. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.08>.
  55. Evans JD, Chen YP, di Prisco G, Pettis J, Williams V. 2009. Bee cups: single-use cages for honey bee experiments. J Apic Res 48:300–302. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2009.11101548>.
  56. Horn T, Boutros M. 2010. E-RNAi: a web application for the multi-species design of RNAi reagents—2010 update. Nucleic Acids Res 38:W332–W339. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq317>.
  57. Amdam GV, Norberg K, Page JRE, Erber J, Scheiner R. 2006. Down-regulation of *vitellogenin* gene activity increases the gustatory responsiveness of honey bee workers (*Apis mellifera*). Behav Brain Res 169:201–205. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2006.01.006>.
  58. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res 40:e115. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks596>.
  59. Li W, Huang ZY, Liu F, Li Z, Yan L, Zhang S, Chen S, Zhong B, Su S. 2013. Molecular cloning and characterization of juvenile hormone acid methyltransferase in the honey bee, *Apis mellifera*, and its differential expression during caste differentiation. PLoS One 8:e68544. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0068544>.
  60. Schmittgen TD, Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_T$  method. Nat Protoc 3:1101–1108. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.
  61. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23:2947–2948. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>.
  62. Rousset R, Mack JA, Wharton KA, Axelrod JD, Cadigan KM, Fish MP, Nusse R, Scott MP. 2001. *naked cuticle* targets *dishevelled* to antagonize Wnt signal transduction. Genes Dev 15:658–671. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.869201>.
  63. Waldrop S, Chan C-C, Cagatay T, Zhang S, Rousset R, Mack J, Zeng W, Fish M, Zhang M, Amanai M, Wharton KA. 2006. An unconventional nuclear localization motif is crucial for function of the *Drosophila* Wnt/Wingless antagonist *naked cuticle*. Genetics 174:331–348. <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.106.061853>.
  64. Logan CY, Nusse R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. Annu Rev Cell Dev Biol 20:781–810. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126>.
  65. Chen K, Yin L, Nie X, Deng Q, Wu Y, Zhu M, Li D, Li M, Wu M, Huang X. 2013.  $\beta$ -Catenin promotes host resistance against *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. J Infect 67:584–594. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2013.07.025>.
  66. Liu X, Wu S, Xia Y, Li XE, Xia Y, Zhou ZD, Sun J. 2011. Wingless homolog Wnt11 suppresses bacterial invasion and inflammation in intestinal epithelial cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 301:G992–G1003. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00080.2011>.
  67. Silva-García O, Valdez-Alarcón JJ, Baizabal-Aguirre VM. 2014. The Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway controls the inflammatory response in infections caused by pathogenic bacteria. Mediators Inflamm 2014:310183. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/310183>.
  68. Liu X, Lu R, Wu S, Zhang Y-G, Xia Y, Sartor RB, Sun J. 2012. Wnt2 inhibits enteric bacterial-induced inflammation in intestinal epithelial cells. Inflamm Bowel Dis 18:418–429. <http://dx.doi.org/10.1002/ibd.21788>.
  69. Antúnez K, Martín-Hernández R, Prieto L, Meana A, Zunino P, Higes M. 2009. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). Environ Microbiol 11:2284–2290. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01953.x>.
  70. Chaimanee V, Chantawannakul P, Chen Y, Evans JD, Pettis JS. 2012. Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. J Insect Physiol 58:1090–1095. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.04.016>.
  71. Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G. 2008. The *Aedes aegypti* Toll pathway controls dengue virus infection. PLoS Pathog 4:e1000098. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000098>.
  72. Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, Haberstroth A, Blum HE, Cosset F-L, Wakita T, Jaekel D, Doffoel M, Royer C, Soulier E, Schvoerer E, Schuster C, Stoll-Keller F, Bartschlag R, Pietschmann T,



- Barth H, Baumert TF. 2007. Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* **46**:1722–1731. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.21994>.
73. Mutti NS, Dolezal AG, Wolschin F, Mutti JS, Gill KS, Amdam GV. 2011. IRS and TOR nutrient-signaling pathways act via juvenile hormone to influence honey bee caste fate. *J Exp Biol* **214**:3977–3984. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.061499>.
74. Yang X, Cox-Foster DL. 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:7470–7475. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0501860102>.



## Honey bee colony collapse due to acaricide resistant populations of *Varroa destructor*? A case study.

Llorens-Picher M, Martín-Hernández R, Rodríguez-García C, Bernal J, Bernal JL,  
González-Porto AV, Meana A, Higes M.

### Contribución en este trabajo:

Durante el periodo de mi tesis doctoral colaboré en varios de los estudios que se llevaban a cabo en el Centro Apícola Regional dando apoyo a los distintos trabajos que estaban en curso. Mi participación en este trabajo consistió en el análisis por PCR y electroforesis de las muestras recogidas de las colmenas de este estudio para la identificación de las especies de *Nosema* (*N. ceranae* y *N. apis*).



[Click here to view linked References](#)

# **Honey bee colony collapse due to acaricide resistant populations of *Varroa destructor*? A case study**

Miguel Llorens-Picher<sup>a</sup>, Raquel Martín-Hernández<sup>b,c</sup>, Cristina Rodríguez-García<sup>c</sup>, José Bernal<sup>d</sup>, José Luis

Bernal<sup>d</sup>, Amelia Virginia González-Porto<sup>c</sup>, Aránzazu Meana<sup>a</sup>, Mariano Higes<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. Avda Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain.

<sup>b</sup> Instituto de Recursos Humanos para la Ciencia y la Tecnología (INCRECYT), Parque Científico de Albacete, Spain.

<sup>c</sup> Centro de Investigación Apícola y Agroambiental (CIAPA-IRIAF), Laboratorio de Patología Apícola, Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha. Camino de San Martín s/n, 19180 Marchamalo (Guadalajara), Spain.

<sup>d</sup> IU CINQUIMA, Grupo de Química Analítica, Universidad de Valladolid, Valladolid, Spain.

Corresponding author: Miguel Llorens-Picher ([migllore@ucm.es](mailto:migllore@ucm.es), +34620768838). Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. Avda Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid.

The authors wish to thank J. Almagro, J. García, V. Albendea, C. Uceta, M. Gajero and T. Corrales at Laboratorio de Patología Apícola, Centro de Investigación Apícola y Agroambiental (CIAPA), IRIAF, Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha for their technical support. Funding: INIA-FEDER (RTA2013-00042-C10-03-06 and E-RTA2014-00003-C03).



## 0 ABSTRACT

Low efficacy of the treatment against *Varroa destructor* with high loads of phoretic mites and high colony mortality rates was reported in a professional beekeeping farm. In order to evaluate if the low efficacy of Varroa treatments was due to the development of acaricide resistance, fifty-four colonies showing the same clinical signs were sampled and inspected determining colony strength and disease signs. The test for mite resistant to pyrethroids and coumaphos designed by Dr. J. Pettis (USDA-ARS Bee Research Laboratory, Beltsville, Maryland) was performed to detect possible mites resistant to previous applied treatment (Checkmite®, active ingredient coumaphos). Adult bees and stored pollen samples were taken to perform a broad pathogen analysis and neonicotinoid insecticide detection.

Out of the 54 inspected colonies, 12 were found dead (22.2%) with no bees into the hives, while 46.3% of colonies had low worker honey bee population, yet presence of queen or eggs was evidenced in 85.4 % of colonies. Most common findings were chalkbrood mummies (38.88%), phoretic mites (37.03%), and bees with deformed wings (14.81%). Mean Varroa phoretic levels were 9.4% (s.d 2.4) and no resistance to coumaphos was detected. Bee samples analysed by PCR showed presence of *Nosema ceranae*, BQCV, DWV and trypanosomatids in all samples while they were negative to *Nosema apis* and neogregarines. Percentages of worker bees infected by *N. ceranae* were far higher than 40%, a parameter previously related with colony deaths. The pesticide residue test did not detect acetamiprid, clothianidin, fipronil, imidacloprid, thiacloprid or thiamethoxam. All the data from the analysis supported the implication of *N. ceranae* playing a leading role in the dead colonies observed.

Keywords: *Varroa destructor*, *Nosema ceranae*, acaricide, neonicotinoids, colony collapse

## 1 INTRODUCTION

Honey bee populations have been in decline over the last 30 years, with beekeepers routinely losing 30% of their managed colonies every winter (vanEngelsdorp and Meixner 2010; van der Zee et al. 2012). This phenomenon has also affected Spanish apiaries (Higes et al. 2009, 2010, 2013; Bernal et al. 2011) with an important economic impact as Spain has the largest number of bee colonies, the highest honey production and, after Greece, the second largest population of professional beekeepers in the European Union (Ministerio de Agricultura, 2014).

In recent years, local beekeepers have reported a lack of efficacy of the approved veterinary products against *Varroa destructor*, and the development of acaricide resistant populations could be related with this trend. Some authors already described the presence of these resistant populations (Milani et al. 1995; Higes et al. 1999; González-Cabrera et al. 2013; Strachecka et al. 2013; Hubert et al. 2014; Kamler et al. 2016) mainly to pyrethroids. The control of *V. destructor* in Spain is ruled by the RD 608/2006, which establish one compulsory treatment in autumn with an approved veterinary product. This control is not well performed nor supervised as shown by Garrido-Bailón (2012) and Cepero (2016) which increases the risk for the development of these resistant populations (Gisder et al. 2010; Stevanovic et al. 2011; Budge et al. 2015).

In this work a clinical case study from a professional apiary is presented. Veterinary services were demanded by the owner due to high colony losses and the suspicion of a low efficacy of the treatment against *Varroa*. The aim of this work was to determine whether the high levels of *Varroa* mite found in the apiary were due to lack of efficacy of the last product used against *Varroa* (coumaphos, marketed as Checkmite®) or due to any other reason.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Honey bee colonies

Tested colonies belonged to a large-scale beekeeper from La Nava de Ricomalillo, Toledo (x39.651223, y-4.991996), a densely populated beekeeping area. All hives were Layens shaped boxes (71L volume), and as part of his regular beekeeping practices he makes seasonal migration to the surroundings of Ávila (x40.654347, y-4.696222) during three to four months in summer (May to September). In March all

colonies received coumaphos (marketed as Checkmite®) against *V. destructor* applied according to the manufacturer instruction.

Fifty-four weak colonies selected by the beekeeper were sent to CAR (Centro Agrario Regional, Marchamalo, x40.668889, y-3.202222) and isolated in an experimental apiary to be diagnosed at the end of August. Honey bee colonies were examined for the following parameters: number of frames occupied by bees, presence of queen or newly-layed brood, and different disease clinical signs (i.e. phoretic Varroa, chalkbrood mummies, American foulbrood, honey bees with deformed wings and presence of wax moth). Colony welfare status was established according a new proposed standardized system. Based on the mean theoretical bee population per hive in temperate regions (AFSSA, 2009), authors establish a quick-easy rating to define general colony welfare (poor, good, excellent) according to the number of frames covered by bees along the year (see fig.1).

## **2.2 Mite resistant detection test**

The test for mite resistant to fluvalinate and coumaphos designed by Dr. J. Pettis (Pettis, 2005) was performed to verify the presence or absence of resistant mites against those acaricides. Some modifications on the protocol were introduced: it was decided to run five tests on the five chemical treatments approved against Varroa in Spain (coumaphos marketed as Checkmite®, flumethrine marketed as Bayvarol®, fluvalinate marketed as Apistan® and amitraz marketed as Apitraz® and Apivar®); a control test without treatment was also included to determine how the conditions affected the mite mortality; and finally, after incubation period (6h, 35°C) tests were placed in a deep freezer (-80°C, 15 minutes) to collect remaining mites.

## **2.3 Pathogen screening**

Before pooling the honey bees for mite resistant test, worker bee samples were taken from each of the randomly selected colonies to perform different analyses. Varroa detection was realized according OIE methods and as previously described (Higes et al. 2009). Percentages of infection by *Nosema ceranae* were performed as previously described by Higes et al. (2008).

## **DNA and RNA extraction and cDNA generation**

Subsamples of 50 honey bees were used for each of the analyses. Each subsample was macerated in AL buffer 50% (Qiagen) as previously described (Antúnez et al. 2012; Cepero et al. 2014). DNA extraction

was performed exactly as previously described by Martín-Hernández et al. (2012), and RNA extraction and cDNA generation as previously described by Antúnez et al. (2012).

#### **PCR and qRT-PCR reactions for pathogen screening**

Different PCR analysis were performed to get a clear overview of the different pathogens present in the population analysed. For *Nosema apis* and *N. ceranae* detection, PCR was performed as previously described by Martín-Hernández et al. (2012); for trypanosomatids and neogregarines as described by Meeus et al. (2010); Lake Sinai Virus complex (LSV complex) as described by Ravoet et al. (2013); and Acute Bee Paralysis Virus-Kashmir Bee Virus-Israeli Acute Paralysis Virus complex (AKI complex) as performed by Francis and Kryger (2012). Specific primers and probes for the amplification of BQCV and DWV designed by Chantawannakul et al. (2006) were used.

#### **2.4 Stored Pollen analysis**

In order to obtain representative pollen samples from each colony, stored pollen (3 squares of approximately 10 x 10 cm each) collected from the brood chamber combs were extracted aseptically from each honey bee colony (Higes et al. 2009; Bernal et al. 2010). Each pollen sample was divided in two aliquots. One aliquot of 100 g was used for neonicotinoid screening, while part of the other aliquot of 5-10 g was used for palinological analysis. Samples were stored at -20°C until further use.

##### ***Pesticide analysis in stored pollen***

Stored pollen samples from each honey bee colony (100g) were analysed as previously described by Yáñez et al. (2014) to detect the presence of seven neonicotinoid insecticides (acetamiprid, clothianidin, dinotefuran, imidacloprid, nitenpyram, thiacloprid, and thiamethoxam). This methodology subjects samples to a solid-liquid extraction of the neonicotinoids from pollen with dichloromethane, followed by evaporation and reconstitution.

##### ***Palinological analysis***

The palinological analysis was performed as described previously (Higes et al. 2009; Bernal et al. 2010).

### **3 RESULTS**

The visual inspection of colonies evidenced a poor colony welfare status. Out of the 54 inspected colonies, 12 were found dead (22.2%) with no bees into the hives, while 46.3% of colonies had poor welfare status. Presence of queen or eggs was evidenced in 85.4 % of colonies (Fig. 2).

Most common findings were chalkbrood mummies (38.9%), phoretic mites (37.0%), and bees with deformed wings (14.8%). Mean Varroa phoretic levels were 9.4% (sd 2.4).

The test for mite resistance ran at 24 hours showed no evidence of mite resistances according to the interpretation of the test, while at 6 hours it could be suspected resistance to pyrethroids (flumethrine marketed as Bayvarol® and fluvalinate marketed as Apistan®). However, the low number of mites found in the subsamples advised to be cautious on the interpretation (Table 1).

Bee samples analysed by PCR showed the presence of *N. ceranae*, BQCV, DWV and Trypanosomatids in all samples while negative *N. apis* and to neogregarines. All sampled colonies had percentages of infection to *N. ceranae* greater than 60%.

Palinological analyses confirmed that the honeybees foraged mainly on wild plants. No neonicotinoid residues in stored pollen were detected.

#### 4 DISCUSSION

It is widely accepted that *V. destructor* actively participates in the collapse of honey bee colonies (Dainat et al. 2012; Francis et al. 2013). This mite is a devastating ectoparasite to the honey bees still the greatest threat for apiculture worldwide (OIE 2008; Rosenkranz et al. 2010). Although *V. destructor* can be responsible for the loss of colonies itself (Rosenkranz et al. 2010), the mean levels of varroa found in the colonies (9.4%, sd 2.4) and the prevalence (37.03%) does not explain itself the deaths reported by the beekeeper .

During the last decade there has been a report of decreased effectiveness of acaricide strips to treat varroa mite infestations, only being proposed as source of the problem the selection of mite populations resistant to acaricides (Elzen et al. 2000; Mozes-Koch et al. 2000; Martin, 2004; Pettis, 2004). However, in this work, the resistance test did not confirm this hypothesis to be the cause of the low efficacy, so there's a need to find other underlying. One of them could be related to the hive type used. It is important to consider that available treatments are officially evaluated using Langstroth shaped hives (41 Litres

155 volume) while the most widely used shape by large-scale beekeepers in Spain is Layens (70 Litres  
156 volume) leading to systematic treatments under proportioned to the correct dose.

157 Another cause could be related to the presence of other pathogens. It has also being shown the effect of *N.*  
158 *ceranae* parasitisation on the acaricide effectiveness of Varroa mite strip treatments (Botias et al. 2012).  
159 Indeed, the acaricide effect of mite strips showed low effectiveness in colonies with a higher Nosema  
160 parasite load. An easy explanation can be due to the fact that effectiveness of Varroa strip treatments  
161 depends on bees contacting the strips and their subsequent interaction within the colony. As *N. ceranae*  
162 negatively affects the honey bee health at both individual and colony levels (Alaux et al. 2014; Vidau et  
163 al. 2014; Naugh 2014; Wolf et al. 2014; Cepero et al. 2014; Lecocq et al, 2016) this effect should be  
164 considered when assessing acaricide treatments in field conditions as a subclinical consequence of  
165 parasitism by Nosema.

166 It is well accepted that under certain conditions *N. ceranae* causes collapse to honey bee colonies (Betti et  
167 al. 2014; Bekele et al. 2015; Cavigli et al. 2016). Higes et al. (2008, 2009) pointed out a 40% inner bee  
168 parasitisation threshold above which the colony collapsed without the interference of other stressors. Our  
169 results can support the leading role of *N. ceranae* in the affected colonies. This agent produces alterations  
170 in temporal polyethism, foraging activity and in the lifespan of infected bees, all of which can lead to a  
171 strong decline in the population size and colony collapse (reviewed by Higes et al, 2013). These field  
172 observations have recently been corroborated in various mathematical models (Khoury et al. 2011, 2013;  
173 Betty et al. 2014; Perry et al. 2014).

174 Moreover, *N. ceranae* infected colonies with small population show a reduced brood rearing efficiency  
175 and both thermoregulation and brood food production may be dysregulated (Medrzycki et al. 2010;  
176 Hedtke et al. 2011). This fact can explain the high prevalence of chalkbrood mummies found.

177 Trypanosomatids are currently one of the organisms to which research is devoting great attention, because  
178 since *Crithidia mellificae* was discovered in Australia onto honey bees (Langridge and McGhee 1967)  
179 there have been few studies characterizing this parasite or examining its real effect on honey bee colony  
180 health. While their real role still unknown, recently has been correlated their presence with colony loses  
181 in the USA and Belgium, especially when detected in coinfection with *N. ceranae* (Runckel et al. 2011;  
182 Cornman et al. 2012; Ravoet et al. 2013). This coinfection status in depopulated honey bee colonies was  
183 also reported recently by Cepero et al. (2014). Recently a new species was described as *L. passim*

(Schwarz et al. 2015) but its pathogenicity in the bee is still unknown. Honey bees carry more than twenty described RNA viruses, and in Europe, at least 23 viruses infecting bees have been compiled (Gisder and Genersch 2015). Generally, viruses that have the highest prevalence and could be related to the collapse of bee colonies would be those named AKI-complex (ABPV-Kashmir bee virus-Israeli acute bee paralysis virus) (Francis and Kryger. 2012; Francis et al. 2013), black queen cell virus (BQCV) and deformed wing virus (DWV) (Runckel et al. 2011; Mondet et al. 2014). Results shown that both BQCV and DWV were highly prevalent in the honey bee colonies, in agreement with other authors who found them in collapsed colonies (Ravoet et al. 2013; Rodriguez et al. 2014). However, high virus prevalence do not explain themselves the collapse of colonies in all cases (Francis et al. 2013).

Varroa-DVW interaction is described as an important cause of mortality of bee colonies (vanEngelsdorp and Meixner 2010; Francis et al. 2013; Dainat et al. 2012). According to Kuster et al. (2014) *V. destructor* can increase DWV titres by vectoring. There is a positive association between *V. destructor* mites and DWV, so the more *V. destructor* mites parasitizing the higher DWV titers (Nazzi et al. 2012; Kuster et al. 2014). The DWV prevalence found can be explained by the levels of Varroa mite in the colonies.

Long ago was observed that BQCV multiplied rapidly in adult bees infected with *N. apis* (Bailey 1981, 1982), probably due to the microsporidian infects midgut tissues of the adult bees, increasing the susceptibility of the alimentary tract to infection by the virus (Chen and Siede 2007) or due to activation of virus replication as the gut is the major reservoir for replication of BQCV (Chen et al. 2006). The gut is also the target organ for infection by *N. ceranae*, and the same relationship could be expected. This association between *N. ceranae* and BQCV have been recently reported (Dainat et al. 2012; Francis et al., 2014) and results found might support this relationship.

Although neonicotinoids exhibited severe acute and sublethal effects on bees (Desneux et al. 2007; Belzunces et al. 2012; Henry et al. 2012), their role as sole cause of colony loss is still not clear (Johnson, 2015). In this case study, the low health status of the colonies cannot be related to neonicotinoids.

The scenario of this case report is a situation increasingly found in Spain. The microsporidia *N. ceranae* acted as chronic stressor affecting the population structure and their polyethism and so causing an increasing lack of workers (Higes et al, 2013). This triggered the Varroa multiplication and favoured the appearance of brood diseases, and both the Varroa and Nosema loads explain the high levels of virus found. Large-scale beekeepers in Spain generally manage big number of hives spread in different sites

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

213 and practice migration. This leads to a lack of heath management in their productions. Moreover, those  
214 professionals manage Layens shaped hives, whose measures require *ad hoc* efficacy studies and longer  
215 commercial strips than available.

216

217



## REFERENCES

- Alaux C, Crauser D, Pioz M, Saulnier C, Le Conte Y (2014) Parasitic and immune modulation of flight activity in honey bees tracked with optical counters. *Journal of Experimental Biology* 217(19):3416-3424
- Antúnez K, Anido M, Garrido-Bailón E, Botías C, Zunino P, Martínez-Salvador A, Martín-Hernández R, Higes M (2012) Low prevalence of honeybee viruses in Spain during 2006 and 2007. *Res Vet Sci* 93:1441–1445
- Bekele AZ, Mor SK, Phelps NB, Goyal SM, Armien AG (2015) A case report of *Nosema ceranae* infection in honey bees in Minnesota, USA. *Vet Q.* 2015 35(1):48-50
- Belzunces LP, Tchamitchian S, Brunet J-L (2012) Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie* 43:348–37
- Bernal J, Garrido-Bailón E, Del Nozal MJ, González-Porto AV, Martín-Hernández R, Diego JC, Jiménez JJ, Bernal JL, Higes M (2010) Overview of pesticide residues in stored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. *J Econ Entomol* 103:1964–1971
- Bernal J, Martín-Hernández R, Diego JC, Nozal MJ, González-Porto AV, Bernal JL, Higes M (2011) An exposure study to assess the potential impact of fipronil in treated sunflower seeds on honey bee colony losses in Spain. *Pest Manag Sci* 67:1320–1331
- Betti M, Wahl L, Zamir M (2014) Effects of infection on honey bee population dynamics: A model. *Plos One* 9(10):e110237
- Botías C, Martín-Hernández R, Barrios L, Meana A, Higes M (2013) *Nosema spp.* infection and its negative effects on honey bees (*apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Veterinary Research*, 44(1)25-25
- Budge GE, Pietravalle S, Brown M, Laurenson L, Jones B, Tomkies V, Delaplane KS (2015) Pathogens as predictors of honey bee colony strength in england and wales. *PloS One* 10(7):e0133228
- Cavigli I, Daughenbaugh KF, Martin M, Lerch M, Banner K, Garcia E, Brutscher LM, Flenniken ML (2016) Pathogen prevalence and abundance in honey bee colonies involved in almond pollination. *Apidologie* 47:251-266

245           Cepero A. Monitorización de los principales patógenos de las abejas para la detección de alertas y  
246 riesgos sanitarios. Doctoral Thesis. Universidad Complutense de Madrid, 2016.

247           Cepero A, Ravoet J, Gómez-Moracho T, Bernal JL, Del Nozal MJ, Bartolomé C, Maside X,  
248 Meana A, González-Porto AV, de Graaf DC, Martín-Hernández R, Higes M (2014) Holistic screening of  
249 collapsing honey bee colonies in Spain: a case study. BMC Research Notes 7:749

250           Chantawannakul P, Ward L, Boonham N, Brown M (2006) A scientific note on the detection of  
251 honeybee viruses using real-time PCR (TaqMan) in varroa mites collected from a thai honeybee (*apis*  
252 *mellifera*) apiary. Journal of Invertebrate Pathology 91(1):69-73

253           Chen YP, Pettis JS, Collins A, Feldlaufer F (2006) Prevalence and Transmission of Honeybee  
254 Viruses. Applied and Environmental Microbiology 72:606-611

255           Chen YP, Siede R (2007) Honey bee viruses. Advances in Virus Research 70:33-80

256           Cornman RS, Tarpy DR, Chen Y, Jeffreys L, Lopez D, Pettis JS, Evans JD (2012) Pathogen  
257 webs in collapsing honey bee colonies. Plos One 7(8)e43562

258           Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L, Neumann P (2012) Predictive markers of honey bee  
259 colony collapse. Plos One 7(2)e32151

260           Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM (2007) The sublethal effects of pesticides on beneficial  
261 arthropods. Annu Rev Entomol 52:81–106

262           Elzen PJ, Baxter JR, Spivak M, Wilson WT (2000) Control of *Varroa jacobsoni* Oud. resistant to  
263 fluvalinate and amitraz using coumaphos. Apidologie 31:437–441

264           Francis RM, Kryger P (2012) Single assay detection of acute bee paralysis virus, kashmir bee  
265 virus and israeli acute paralysis virus. Journal of Apicultural Science 56:137-146

266           Francis RM, Nielsen SL, Kryger P (2013) Varroa-virus interaction in collapsing honey bee  
267 colonies. Plos One 8(3)e57540

268           Francis R, Amiri E, Meixner M, Kryger P, Gajda A, Andonov S, Wilde J (2014) Effect of  
269 genotype and environment on parasite and pathogen levels in one apiary - a case study. Journal of  
270 Apicultural Research 53(2)230-232

271 Garrido-Bailón, E. Repercusión potencial en la cabaña apícola española de agentes nosógenos  
272 detectados en colonias de *Apis mellifera iberiensis*. Universidad Complutense de Madrid, 2012.

273 Gisder S, Hedtke K, Möckel N, Frielitz M, Linde A, Genersch E (2010) Five-Year Cohort Study  
274 of *Nosema spp.* in Germany: Does Climate Shape Virulence and Assertiveness of *Nosema*  
275 *ceranae*? Applied and Environmental Microbiology 76:3032-3038

276 González-Cabrera J, Davies TGE, Field LM, Kennedy PJ, Williamson MS (2013) An Amino  
277 Acid Substitution (L925V) Associated with Resistance to Pyrethroids in *Varroa destructor*. PLoS ONE  
278 8(12): e82941

279 Hedtke K, Jensen PM, Jensen AB, Genersch E (2011) Evidence for emerging parasites and  
280 pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalkbrood. Journal of Invertebrate  
281 Pathology 108:167-173

282 Henry M, Béguin M, Requier F, Rollin O, Odoux J-F, Aupinel P, Aptel J, Tchamitchian S,  
283 Decourtye A (2012) A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. Science  
284 336:348–50

285 Higes M, Meana A, Suarez M, Llorente J (1999) Negative long-term effects on bee colonies  
286 treated with oxalic acid against *Varroa jacobsoni* Oud. Apidologie 30:289-292

287 Higes M, Martín-Hernández R, Botías C, Garrido-Bailón E, González-Porto AV, Barrios L, Del  
288 Nozal MJ, Bernal JL, Jiménez JJ, García-Palencia P, Meana A (2008) How natural infection by *Nosema*  
289 *ceranae* causes honeybee colony collapse. Environ Microbiol 10:2659–2669

290 Higes M, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, González-Porto AV, García-Palencia P,  
291 Meana A, Del Nozal MJ, Mayo R, Bernal JL (2009) Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in  
292 professional apiaries. Environ Microbiol Rep 1:110–113

293 Higes M., Martín-Hernández R., Meana A (2010) *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type  
294 C nosemosis. Apidologie 41:375–392

295 Higes M, Meana A, Bartolomé C, Botías C, Martín-Hernández R (2013) *Nosema ceranae*  
296 (microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. Environ Microbiol Rep 5:17–29

297 Hubert J, Nesvorna M, Kamler M, Kopecky J, Tyl J, Titera D, Stara J (2014) Point mutations in  
298 the sodium channel gene conferring tau-fluvalinate resistance in *Varroa destructor*. Pest Management  
299 Science 70(6):889-894

300 Johnson RM (2015) Honey bee toxicology. Annual Review of Entomology 60:415-34

301 Kamler M, Nesvorna M, Stara J, Erban T, Hubert J (2016) Comparison of tau-fluvalinate,  
302 acrinathrin, and amitraz effects on susceptible and resistant populations of *Varroa destructor* in a vial test.  
303 Exp Appl Acarol 69(1):1-9

304 Khoury DS, Myerscough MR, Barron AB (2011) A quantitative model of honey bee colony  
305 population dynamics. Plos One 6(4):e18491

306 Khoury DS, Barron AB, Myerscough MR (2013) Modelling food and population dynamics in  
307 honey bee colonies. Plos One 8(5):e59084

308 Kuster R, Boncristiani H, Rueppell O (2014) Immunogene and viral transcript dynamics during  
309 parasitic *Varroa destructor* mite infection of developing honey bee (*Apis mellifera*) pupae. Journal of  
310 Experimental Biology 217:1710-1718

311 Langridge DF, Barclay McGhee R (1967) *Crithidia mellificae* n. sp. An acidophilic  
312 trypanosomatid of the honey bee *Apis mellifera*. The Journal of protozoology 14(3):485-7

313 Lecocq A, Jensen AB, Kryger P, Nieh JC (2016) Parasite infection accelerates age polyethism in  
314 young honey bees. Sci Rep 25(6):22042

315 Martin SJ (2004) Acaricide (pyrethroid) resistance in *Varroa destructor*. Bee World 85:67–69

316 Martín-Hernández R, Botías C, Garrido-Bailón E, Martínez-Salvador A, Prieto L, Meana A,  
317 Higes M (2012) Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae*  
318 replacing *Nosema Apis*? Environ Microbiol 14:2127-2138

319 Medrzycki P, Sgolastra F, Bortolotti L, Bogo G, Tosi S, Padovani E, Porrini C, Sabatini AG  
320 (2010) Influence of brood rearing temperature on honey bee development and susceptibility to poisoning  
321 by pesticides. J Apicult Res 49:52–59

322 Meeus I, de Graaf DC, Jans K, Smaghe G (2010) Multiplex PCR detection of slowly-evolving  
323 trypanosomatids and neogregarines in bumblebees using broad-range primers. J Appl Microbiol 109:107–  
324 115

325 Milani N (1995) The resistance of *Varroa jacobsoni* Oudemans to pyrethroids: a laboratory  
326 assay. Apidologie 26(5):415-429

327 Ministerio de Agricultura y Medio Ambiente: El Sector de la Miel en Cifras. Principales  
328 Indicadores Económicos en 2014. Subdirección General de Productos Ganaderos, 2015.  
329 [http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-](http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/indicadoreseconomicossectordelamiel2014_tcm7-381460.pdf)  
330 [ganaderos/indicadoreseconomicossectordelamiel2014\\_tcm7-381460.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/indicadoreseconomicossectordelamiel2014_tcm7-381460.pdf)

331 Mondet F, de Miranda J, Kretzschmar A, Le Conte Y, Mercer A, Sveriges L (2014) On the front  
332 line: Quantitative virus dynamics in honeybee (*apis mellifera* L.) colonies along a new expansion front of  
333 the parasite *varroa destructor*. Plos Pathogens 10(8)e1004323

334 Mozes-Koch R, Slabezki Y, Efrat H, Kalevi H, Kamer Y, Yakobson BA, Dag A (2000) First  
335 detection in Israel of fluvalinate resistance in the varroa mite using bioassay and biochemical methods.  
336 Exp Appl Acarol 24:35–43

337 Naug D (2014) Infected honeybee foragers incur a higher loss in efficiency than in the rate of  
338 energetic gain. Biol. Lett. 10:20140731

339 Nazzi F, Brown SP, Annoscia D, Del Piccolo F, Di Prisco G, Varricchio P, Della Vedova G,  
340 Cattonaro F, Caprio E, Pennacchio F (2012) Synergistic parasite–pathogen interactions mediated by host  
341 immunity can drive the collapse of honeybee colonies. PLoS Pathog 8:e1002735

342 OIE (2008) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Varroosis.  
343 Chapter 2.9.5. OIE. Available at: [http://web.oie.int/fr/normes/mmanual/A\\_00124.htm](http://web.oie.int/fr/normes/mmanual/A_00124.htm). Last visit:  
344 21/07/2016

345 Perry CJ, Sovik E, Myerscough MR, Barron AB (2015) Rapid behavioral maturation accelerates  
346 failure of stressed honey bee colonies. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(11)3427–  
347 3432

- Pettis J (2004) A scientific note on *Varroa destructor* resistance to coumaphos in the United States. *Apidologie* 35:91–92
- Pettis J (2005) Test Detecting Varroa Mite Resistance to Apistan, Apivar & Coumaphos (USDA-ARS Bee Research Laboratory, Beltsville, Maryland) Available at: [http://www2.gov.bc.ca/assets/gov/farming-natural-resources-and-industry/agriculture-and-seafood/animal-and-crops/animal-production/bee-assets/api\\_fs223.pdf](http://www2.gov.bc.ca/assets/gov/farming-natural-resources-and-industry/agriculture-and-seafood/animal-and-crops/animal-production/bee-assets/api_fs223.pdf)
- Ravoet J, Maharramov J, Meeus I, De Smet L, Wenseleers T, Smagghe G, de Graaf DC (2013) Comprehensive bee pathogen creening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality. *PLoS One* 8:e72443
- Rodriguez M, Vargas M, Antunez K, Gerding M, Castro F, Zapata N (2014) Prevalence and phylogenetic analysis of honey bee viruses in the biobio region of chile and their association with other honey bee pathogens. *Chilean Journal of Agricultural Research* 74(2)170-177
- Rosenkranz P, Aumeier P, and Ziegelmann B (2010) Biology and control of *Varroa destructor*. *J Invertebr Pathol* 103:96–119
- Runckel C, Flenniken ML, Engel JC, Ruby JG, Ganem D, Andino R, DeRisi JL (2011) Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PLoS One* 6:e20656
- Schwarz RS, Bauchan GR, Murphy CA, Ravoet J, De Graaf DC, Evans JD (2015) Characterization of two species of trypanosomatidae from the honey bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, 1967 and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 0:1–17
- Stevanovic J, Stanimirovic Z, Genersch E, Kovacevic SR, Ljubenkovic J, Radakovic M, Aleksic N (2011) Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie* 42:49-58
- Strachecka A, Sawicki M, Borsuk G, Olszewski K, Paleolog J, Bajda M, Chobotow J (2013) Use of acaricides for fighting *Varroa destructor* mites in bee colonies: efficiency and risk. *Medycyna Weterynary JNA* 60(4):219-224

375 van der Zee R, Pisa L, Andonov S, Brodschneider R, Charriere JD, Chlebo R *et al.* (2012)

376 Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008-9

377 and 2009-10. Journal of Apicultural Research 51:91-114

378 vanEngelsdorp D, Meixner MD (2010) A historical review of managed honey bee populations in

379 Europe and the United States and the factors that may affect them. Journal of Invertebrate Pathology

380 103:S80–S95

381 Vidau C, Panek J, Texier C, Biron D, Belzunces L, Le Gall M, El Alaoui H (2014) Differential

382 proteomic analysis of midguts from *nosema ceranae*-infected honeybees reveals manipulation of key host

383 functions. Journal of Invertebrate Pathology 121:89-96

384 Wolf S, McMahon DP, Lim KS, Pull CD, Clark SJ, Paxton RJ, Osborne JL (2014) So near and

385 yet so far: Harmonic radar reveals reduced homing ability of nosema infected honeybees. PloS

386 One 9(8):e103989

387 Yáñez KP, Martín MT, Bernal JL, Nozal MJ, Bernal J (2014) Trace analysis of seven

388 neonicotinoid insecticides in bee pollen by solid–liquid extraction and liquid chromatography coupled to

389 electrospray ionization mass spectrometry. Food Anal Methods 7:490–499

390

391

392

393

394

395 Table 1. Resistance test results at 6 and 24 hours

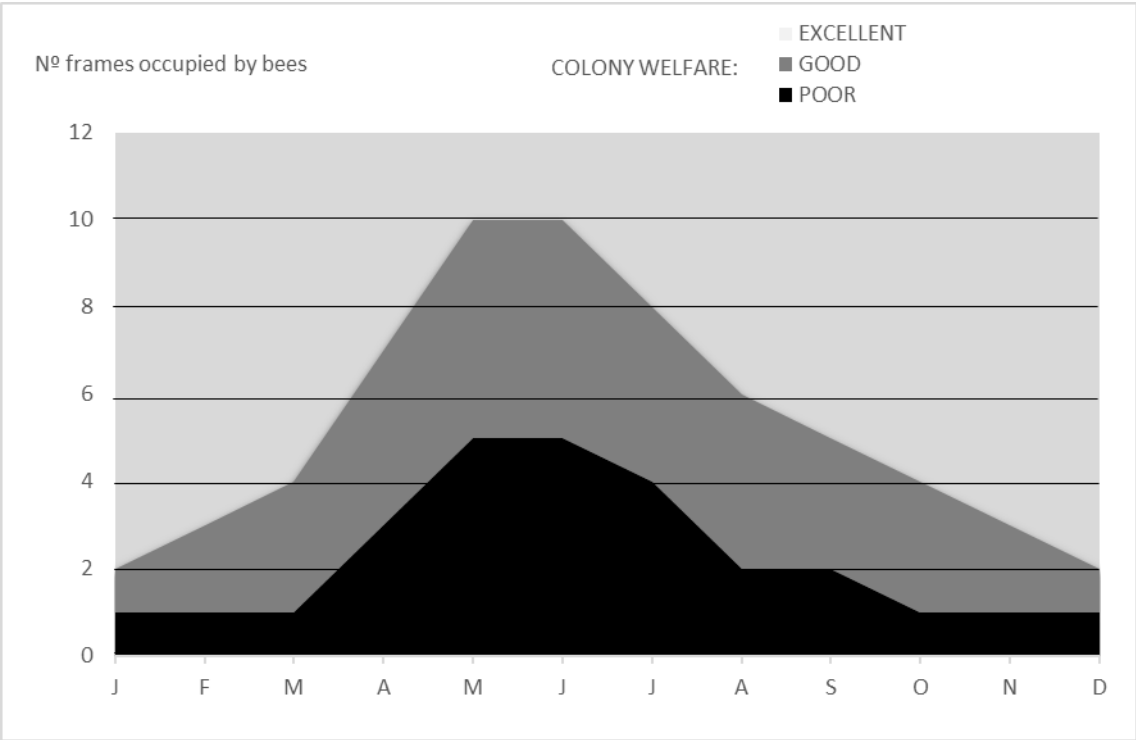
| Product    | Mites dead<br>at 6h | Mites dead<br>after 6h | Resistance<br>at 6h | Mites dead<br>at 24h | Mites dead<br>after 24h | Resistance<br>at 24h |
|------------|---------------------|------------------------|---------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|
| Checkmite® | 8                   | 0                      | No                  | 12                   | 0                       | No                   |
| Bayvarol®  | 2                   | 3                      | Yes                 | 6                    | 0                       | No                   |
| Apistan®   | 0                   | 3                      | Null                | 8                    | 2                       | No                   |
| Apivar®    | 8                   | 0                      | No                  | 10                   | 0                       | No                   |
| Apitraz®   | 7                   | 0                      | No                  | 11                   | 1                       | No                   |

396 Control was Null as it contained less than five mites.

397



398 Fig.1 Standardized system to establish the colony welfare (poor, good, excellent) in Spain according to the  
399 number of frames covered by bees during the year.



405 Fig. 2 Welfare status of inspected colonies according to the standardized system.

